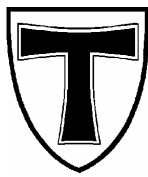

Die Regulation von Wachstumsfaktoren durch Faktor VII-aktivierende Protease



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
im Fachbereich 08; Biologie und Chemie
an der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Elfie Kathrin Rödel

Diplom-Biologin

aus Offenbach am Main

Gießen, im Juni 2012

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Friedhoff

Institut für Biochemie
Fachbereich Biologie und Chemie
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. Sandip M. Kanse

Institut für Biochemie
Fachbereich Medizin
Justus-Liebig-Universität Gießen

3. Prüferin: Prof. Dr. Veronika Grau

Sektion Experimentelle Chirurgie
Fachbereich Medizin
Justus-Liebig-Universität Gießen

4. Prüferin: Prof. Dr. Tina Trenczek

Institut für Allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie
Fachbereich Biologie und Chemie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der mündlichen Prüfung: 17.08.2012

Erklärung

„Ich erkläre: Ich, Elfie K. Rödel (geb. 14.05.1983) habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Giessen, den 30.06.2012

Elfie Kathrin Rödel

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Die Entstehung von Arteriosklerose	1
1.2 Vaskuläre Kalzifizierung	2
1.3 Faktor VII-aktivierende Protease (FSAP)	5
1.3.1 Die Struktur der FSAP	6
1.3.2 Regulation der FSAP Aktivität	7
1.3.3 FSAP als kardiovaskulärer Risikofaktor	9
1.3.4 Funktionen der FSAP	10
1.3.5 FSAP-Interaktion mit Wachstumsfaktoren	11
1.4 Die <i>Transforming growth factor</i> - β Superfamilie	13
1.4.1 Funktion und Regulation der <i>Bone morphogenetic proteins</i> (BMPs)	14
1.4.2 Bedeutung und Regulation der Prodomäne	18
1.4.3 Funktionen von BMP-2	22
2 Aufgabenstellung	24
3 Materialien	25
4 Methoden	28
4.1 Zellkultur	28
4.2 Proteinspezifische Methoden	31
4.3 DNA spezifische Methoden	33
4.4 DNA Klonierung	35
4.5 Zytologische Techniken	38
4.6 Statistische Auswertung	38
5 Ergebnisse	39
5.1 FSAP steigert die biologische Aktivität von BMP-2	39
5.2 Analyse der Substratspezifität diverser Proteasen und BMP-2 Spaltung	43
5.3 FSAP aktiviert die latente Proform von BMP-2	45

5.4	Analyse der der pro-BMP-2 Spaltung durch Substratspezifität diverser Proteasen..	49
5.5	Vergleich der FSAP und Plasmin induzierten BMP-Aktivierung	50
5.6	FSAP steigert die Smad-abhängigen Proliferationsinhibierung sowie BMP-2 Akkumulation in C2C12 Myoblasten	53
5.7	Bindungsstudie von FSAP an BMP-2 und pro-BMP-2	56
5.8	Endogene FSAP und die BMP-2 Prozessierung in Hepatozyten	57
5.9	BMP-2 Aktivierung in VSMCs durch FSAP	60
5.10	Expression und Aktivität von rekombinanten pro-BMP-2 und Mutanten	62
5.11	Pro-GDF-5 wird aktiviert durch FSAP	72
5.12	FSAP hat keinen Effekt auf die TGF- β -1 Funktion	73
6	Diskussion	75
7	Zusammenfassung	97
8	Summary.....	99
9	Literatur	101
10	Publikationsliste	118
11	Lebenslauf	120
12	Danksagung	121

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Die arteriosklerotische intimale Verkalkung.....	S.4
Abb. 2. Struktur und Regulatoren der FSAP.....	S.8
Abb. 3. Die Mitglieder der TGF- β Superfamilie.....	S.14
Abb. 4. BMP-Rezeptoren und ihre Liganden.....	S.15
Abb. 5. Intrazelluläre und extrazelluläre BMP-Regulation.....	S.18
Abb. 6. Prozessierung der Proformen verschiedener TGF- β Superfamilien Mitglieder.....	S.19
Abb. 7. Regulation der Prodomäne der TGF- β Superfamilienmitglieder.....	S.21
Abb. 8. FSAP verstärkt die biologische Aktivität von BMP-2.....	S.38
Abb. 9. Charakterisierung der Effekte von FSAP auf BMP-2.....	S.39
Abb. 10. FSAP spaltet BMP-2 am Amino-terminalen Ende.....	S.40
Abb. 11. Vergleichsstudie diverser Proteasen auf BMP-2	S.42
Abb. 12. FSAP führt zu einer Aktivierung der latenten Proform von BMP-2.....	S.44
Abb. 13. Inaktives pro-BMP-2 wird durch FSAP in seine reife aktive Form gespalten.....	S.45
Abb. 14. FSAP aktiviert pro-BMP-2 konzentrations- und zeitabhängig.....	S.46
Abb. 15. Vergleich der pro-BMP-2 Aktivierung durch diverse extrazelluläre Proteasen.....	S.47
Abb. 16. Vergleich der FSAP und Plasmin induzierten BMP Prozessierung.....	S.48
Abb. 17. Vergleich der FSAP und Plasmin induzierten Spaltung von BMP-2.....	S.49
Abb. 18. Vergleich der FSAP und Plasmin induzierten Spaltung von pro-BMP-2.....	S.50
Abb. 19. Smad1/5/8 Phosphorylierung in BMP stimulierten C2C12 Myoblasten.....	S.51
Abb. 20. Aktiviertes BMP-2 inhibiert die Proliferation in C2C12 Myoblasten.....	S.52
Abb. 21. FSAP stimuliert BMP-2 und pro-BMP-2 Akkumulation in Myoblasten.....	S.53
Abb. 22. FSAP Bindungsstudie an immobilisiertes BMP-2 und pro-BMP-2.....	S.54
Abb. 23. Endogenes FSAP spaltet pro-BMP-2 in AML12 Zellen.....	S.56
Abb. 24. Herunterregulation von FSAP durch siRNA in AML12 Zellen und BMP-2 Aktivierung.....	S.57
Abb. 25. Smad1/5/8 Phosphorylierung in stimulierten VSMCs.....	S.58
Abb. 26. FSAP aktiviert BMP-2 und steigert die Expression der BMP-2 Zielgene in VSMCs..	S.59
Abb. 27. Klonierung des Plasmids pSecTag2A_pro-BMP-2 für die Expression in Eukaryoten.....	S.61
Abb. 28. Sekretion von rekombinanten pro-BMP-2 nach Furininhibitor Behandlung.....	S.62
Abb. 29. Sekretiertes pro-BMP-2 wird durch FSAP aktiviert.....	S. 63
Abb. 30. Schema der Mutationsstudie von pro-BMP-2.....	S.64
Abb. 31. Aktivitätstest der verschiedenen pro-BMP-2 Mutanten nach FSAP Behandlung.....	S.64
Abb. 32. FSAP spaltet alle pro-BMP-2 Mutanten.....	S.65

Abb. 33. Zeitabhängige Proteolyse von mutierten pro-BMP-2 durch FSAP.....	S.68
Abb. 34. Schema der Triple-Mutationsstudie von pro-BMP-2.....	S.69
Abb. 35. Analyse der Sekretion und Prozessierung der pro-BMP-2 Triple-Mutanten.....	S.70
Abb. 36. Die Triple-Mutation SSS ²⁸⁹ innerhalb der reifen BMP-2 Kette schützt vor der FSAP Aktivierung.....	S.71
Abb. 37. Pro-GDF-5 wird aktiviert durch FSAP.....	S.72
Abb. 38. Konzentrations- und zeitabhängige Proteolyse von pro-GDF-5 durch FSAP.....	S.73
Abb. 39. FSAP hat keinen Einfluss auf die biologische Aktivität von TGF- β -1.....	S.74
Abb. 40. FSAP hat keinen Einfluss auf die TGF- β -1 Prozessierung.....	S.74
Abb. 41. Schematische Darstellung der BMP-2 Sekundärstruktur.....	S.77
Abb. 42. Vergleich der bisher identifizierten Spaltstellen von pro-BMP-2.....	S.81
Abb. 43. Vergleich der bisher identifizierten Spaltstellen von pro-GDF-5.....	S.83
Abb. 44. Bisher identifizierte Spaltstellen der FSAP Substrate.....	S.87
Abb. 45. Putativer Regulationsmechanismus der Osteoblasten Differenzierung durch FSAP...	S.91
Abb. 46. Rekapitulation der FSAP Funktion und Marburg I als Risikofaktor.....	S.96

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	dNTP	Desoxynukleotid-Tri-Phosphat
ALP	Alkalische Phosphatase	drBMP-2	<i>Digit removed BMP-2</i>
ActR	Aktivinrezeptor	E	EGF (<i>Epidermal growth factor</i>)-Domäne
ALK	<i>Activin receptor-like kinase</i>	EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
AMH	<i>Anti-Mullerian Hormone</i>	EDTA	<i>Ethylendiaminetetraacetic acid</i>
APC	Aktiviertes Protein C	ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbant assay</i>
Aprot.	Aprotinin	EGF	<i>Epidermal-growth-factor</i>
Arg	Arginin	ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
Asp	Asparagin	et al.	<i>et alteri</i> (und andere)
ATP	Adenosintriphosphat	<i>Fbn1</i>	Fibrillin-1
BAMBI	<i>BMP and Activin membrane-bound inhibitor</i>	FCS	<i>Fetal calf serum</i>
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>	FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>	FI	Furininhibitor
BMP1/TLD	BMP-1/Tolloid-ähnliche Metalloproteinase	FITC	Fluorescein Isothiocyanat
BMPER	<i>BMP endothelial cell precursor-derived regulator</i>	FSAP	<i>Factor VII activating protease</i>
BMPRIA	BMP Rezeptor IA	FVIIa	Aktivierter Faktor VII
BrDU	<i>5-bromo-2-deoxyuridine</i>	FXa	Aktivierter Faktor X
BRI	BMP Rezeptor Typ I	g	Gramm; Erdbeschleunigung
BRII	BMP Rezeptor Typ II	GAG	Glykosaminoglykan
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>	GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
CASMC	<i>Coronary Artery Smooth Muscle Cells</i>	GDF	<i>Growth and differentiation factor</i>
Cbfa1	<i>Core binding factor alpha 1</i>	h	Stunde
CDMPs	<i>Cartilage-derived morphogenetic proteins</i>	<i>HABP2</i>	<i>Hyaluronic acid binding protein-2</i>
cDNA	Komplementäre DNA	<i>Hamp</i>	Hepcidin
Col2a	<i>Collagen type II alpha</i>	Hep.	Heparin
COMP2	<i>Cartilage oligomeric matrix protein</i>	HGF-A	<i>Hepatocyte growth factor activator</i>
Dan	Dan-Protein	His	Histidin
DAPI	<i>4'-6-diamidino-2-phenylindole dehydrate</i>	HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
DNA	Desoxynukleinsäure	HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>

ICAM-1	<i>Intracellular adhesion molecule</i>	n	Stichprobenanzahl
Id1	<i>Inhibitor of DNA binding 1</i>	NFκB	Nukleärer Faktor κB
IgG	Immunoglobulin G	ng	Nanogramm
IL-8	Interleukin-8	NGF	<i>Nerve growth factor</i>
JNK	C-Jun N-terminale Kinase	NK	Negativ Kontrolle
K	Kontrolle	nm	Nanometer
kDa	Kilo Dalton	nM	Nanomolar
L	Liter	NTR	Amino-Terminusregion
LAP	<i>Latency-associated peptide</i>	OD	Optische Dichte
LIMK1	LIM Kinase 1	OPG	Osteoprotegerin
LPS	Lipopolysaccharide	OPN	Osteopontin
LRP	<i>Low-density lipoprotein receptor related protein</i>	OPs	<i>Osteogenic proteins</i>
LTBP	<i>Latency binding protein</i>	P	Proteasedomäne
M	Molar (Mol pro Liter)	PAI	<i>Plasminogen activator inhibitor</i>
mAb	Monoklonaler Antikörper	PAR	<i>Protease activated receptor</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>	PCR	Polymerasekettenreaktion
MCP	<i>Macrophage-chemotactic protein</i>	PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
M-CSF	<i>Macrophage-colony stimulating factor</i>	PDGFRα	PDGF-Rezeptor α
MFS	Marfan-Syndrom	PDGFRβ	PDGF-Rezeptor β
mg	Milligramm	pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung
MI	Marburg I Polymorphismus	PHBP	<i>Plasma hyaluronan binding protein</i>
MI-FSAP	Marburg I-FSAP	PHBSP	<i>Plasma hyaluronan binding serine protease</i>
min	Minute	PI3K	Phosphatidyl-3-Kinase
MIS	<i>Müllerian– inhibiting substance</i>	Plg	Plasminogen
ml	Milliliter	pmol	Picomol
MLEC	<i>Mink Lung Epithelial Cells</i>	POD	Peroxidase
MMP	Matrixmetalloproteinase	PPACK	D-Phenylalanyl-L-Propyl-L-Arginin Chloromethyl Keton
mM	Millimolar	PTH	Parathyroid Hormon
mol	Mole (6,023 x 10 ²³ Teilchen)	PVDF	Polyvinylidene Fluorid
Msx2	<i>Msh homeobox 2</i>	qPCR	quantitative Echtzeit PCR

RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor κB</i>	TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i>
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor κB ligand</i>	TGF- β -1	<i>transforming growth factor β-1</i>
RGM(a/b/c)	<i>Repulsive guidance molecule</i>	Thr	Threonin
RIPA	<i>radio immunoprecipitation assay</i>	TLR	<i>Toll-like receptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure	TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute	tPA	<i>Tissue type plasminogen activator</i>
ROR2	<i>Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2</i>	TRKC	<i>Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 3</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>	Tsg	<i>Twisted gastrulation</i>
rSMAD	Regulatorisches SMAD	TSG-6	<i>Tumor-necrosis factor induced protein-6</i>
RT	Raumtemperatur	U	Unit
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR	uPA	Urokinase
RUNX2	<i>Runt-related transcription factor-2</i>	UV	ultraviolett
SBE	<i>SMAD binding element</i>	V	Volt; Vektor
ScR	<i>Scavenger receptor</i>	Vol.	Volumen
SDS	<i>Sodium-dodecyl-Sulfate</i>	v/v	<i>volume per volume</i>
Sek	Sekunde	VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
Ser	Serin	VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
SERPIN	Serinprotease Inhibitor	VLDL	<i>Cholesterol-rich very low-density lipoprotein</i>
SMAD	<i>Mothers against decapentaplegic homolog</i>	VSMC	<i>Vascular Smooth Muscle Cell</i>
SNP	Einzelnukeotidpolymorphismus	w/v	<i>weight per volume</i>
Sox9	<i>(Sex determining region Y)-box containing gene 9</i>	WT	Wildtyp
Src	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i>	μ g	Mikrogramm
TAK1	<i>TGF-β activated kinase 1</i>	μ l	Mikroliter
TF	<i>Tissue factor</i>		

1 Einleitung

Das kardiovaskuläre System ist ein ausgeklügeltes Transport- und Verteilersystem der höheren Lebewesen. Die Aufrechterhaltung des Blutdrucks und des Blutflusses wird neben dem Herzschlag auch durch das Endothelium ermöglicht. Spontane Gefäßverletzungen, sowie chronische Entzündungsreaktionen führen zu einer Aktivierung des Endothels, der Sezernierung diverser Signalstoffe, und der Remodellierung des Gefäßes. Remodellierungsprozesse sind präzise reguliert, und spielen eine wichtige Rolle bei vaskulären Erkrankungen wie Arteriosklerose und vaskulärer Kalzifizierung.

1.1 Die Entstehung von Arteriosklerose

Eine chronische vaskuläre Entzündung führt zu krankhaften Veränderungen der Gefäßwand und kann die Entstehung von vaskulärer Kalzifizierung und Arteriosklerose fördern. Dies birgt das Risiko, dass Gefäße ihre dynamische Kontraktilität verlieren und prothrombotische Eigenschaften entwickeln (Donghyun Lee 2011). Im Folgenden soll die Entstehung der Arteriosklerose näher beleuchtet werden.

Für die Initiierung der Arteriosklerose sind vor allem die Proteine *Cholesterol-rich very low-density lipoprotein* (VLDL) und *low-density lipoprotein* (LDL) verantwortlich (Libby et al., 2011). Diese Plasma-Proteine können durch Oxidation (oxLDL) stark reaktiv werden. Dies hat die Aktivierung des Endothels zur Folge, die mit einer gesteigerten Expression von membranständigen Zelladhäsionsmolekülen (*vascular cell adhesion molecule* VCAM-1 und *intracellular adhesion molecule* ICAM-1) reagiert (Libby et al., 2011). Diese Membrankomponenten vermitteln das Rollen und die Anheftung von Entzündungszellen wie Monozyten, Lymphozyten sowie Plättchen (Nakashima et al., 1998; Massberg et al., 2002). Angelowkt durch chemotaktische Stimuli wie *macrophage-chemotactic protein* (MCP/CCL), *macrophage-colony stimulating factor* (M-CSF) oder Interleukin-8 (IL-8) infiltrieren diese Zellen das Gewebe. Anschließend werden durch *transforming growth factor β -1* (TGF- β -1) infiltrierte Monozyten/Makrophagen angelockt, und eine Monozyten-Adhäsion wird über die extrazelluläre Matrixkomponenten TypIV Kollagen, Laminin und Fibronektin vermittelt (Wahl 1993). TGF- β ist ein wichtiger Faktor, der die Matrix-Proteoglykan-Synthese der vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs) vorantreibt, und die Stabilität des Plaques beeinträchtigt (Amento et al., 1991; Mallat et al., 2001). Eingewanderte Makrophagen durchgehen einen Transdifferenzierungsprozess und exprimieren Zelloberflächenrezeptoren. Dazu gehören *scavenger receptors* (ScRs) und *toll-like receptors* (TLR) (Seneviratne et al., 2012). Durch die Rezeptoren ScRs, CD36, sowie LDL-Rezeptor und

VLDL-Rezeptor kommt es zur Aufnahme von apoptotischen Zellfragmenten und oxLDL (Pennings et al., 2006). Findet eine verstärkte Akkumulation von oxLDL in zytosolischen Fetttröpfchen statt, kommt es zur Transdifferenzierung der Makrophagen in lipidhaltige Schaumzellen (Seneviratne et al., 2012). Die Schaumzellen bilden den Lipidkern der Arteriosklerose. Angefüllt mit oxLDL durchlaufen diese Zellen einen nekrotischen Prozess (Felton et al., 1997). Der Wachstumsfaktor TGF- β erfüllt nun eine duale Rolle: zum einen verstärkt er die Entzündungsreaktion, indem er die Sekretion von IL-1 und -6 stimuliert (Ashcroft 1999; Turner et al., 1990). Auf der anderen Seite hat er einen anti-inflammatorischen Effekt, indem er die Schaumzellgenerierung herauszögert. Dies gelingt durch erhöhte Expression des *ATP-binding cassette transporter-1*, eine gesteigerte Cholesterol-Ausscheidung aus der Zelle sowie einer inhibierten Lipoprotein Lipase-Expression (Panousis et al. 2001; Irvine et al., 2005). Bei der fortgeschrittenen Arteriosklerose kommt es zu der Ausbildung von Fettstreifen, die durch eine fibröse Kappe bedeckt werden (Seneviratne et al., 2012). Dabei handelt es sich um stark proliferierende VSMCs, welche aus der Media in die Intima einwandern und eine kollagenhaltige Matrix mit Proteoglykanen anreichern (Sary et al., 1992). Diese Schicht schützt den Lipidkern vor dem Aufbrechen, und ist Teil der selbstheilenden vaskulären Remodellierungsprozesse. Durch den Aufbau der Kappe reduzieren sich jedoch Gefäßlumen und damit der Blutfluß. Die Stabilität der Kappe kann durch proteolytische Aktivität von Proteinasen reduziert werden. In diesem Zusammenhang sind vor allem die Matrixmetalloproteinasen (MMPs) von Bedeutung, die von aktivierten Makrophagen exprimiert und durch Plasmin in die aktive Form überführt werden können (König and Khuseyinova 2007). MMPs degradieren die Komponenten der extrazellulären Matrix und zerstören somit die Stabilität des Plaques (Hansson et al., 2006). VSMCs sind jedoch nicht nur für einen hyperproliferierenden Phänotyp des Plaques kennzeichnend, sondern können auch einen osteogenen Differenzierungsvorgang durchlaufen. Dabei kommt es während der Atherogenese zur Verkalkung und Versteifung des Gefäß. Im nächsten Abschnitt soll dieser Prozess der VSMCs getriebenen vaskulären Kalzifizierung vorgestellt werden.

1.2 Vaskuläre Kalzifizierung

Ein weiterer Remodellierungsprozess der VSMC innerhalb der Atherogenese ist ihre Eigenschaft zu kalzifizieren. Kalzifizierung der arteriellen Gefäße reduziert die Gefäßelastizität und erhöht das Risiko an arteriellen Hochdruck, Herz-Hypertrophie und Ischämie zu erkranken (Karwowski et al., 2012).

Patienten mit Arteriosklerose, Diabetes, Bluthochdruck oder chronischer Nierenerkrankung und einhergehenden gestörtem Kalzium/Phosphat Serumgehalt (assoziiert mit abnormalem Knochen-

Metabolismus) sind gefährdet, diese Gefäßkrankheit zu erleiden (Nitta 2011). Ein gestörter vaskulärer Kalzium-Gehalt hat einen negativen Effekt auf Cholesterol, Insulin Sekretion und Sensitivität, Vasodilation, Entzündung, Thrombose und führt letztendlich zur Verkalkung (Wang et al., 2012).

Je nach Lokalisation wird die vaskuläre Kalzifizierung unterteilt in vier Arten: (1) mediale Verkalkung (Tunica Media, „Mönckeberg Sklerose“), (2) arteriosklerotische intimale Verkalkung (Abb. 1) (3) valvuläre Verkalkung und (4) vaskuläre Kalziphylaxie (Donghyun Lee 2011).

Der zu Grunde liegende Mechanismus ist jeweils gleich. Durch diverse Faktoren wird eine Transdifferenzierung der VSMCs ausgelöst. Es kommt zu einer Veränderung des VSMCs Phänotyp in einen osteoblastähnlichen Zustand. Es handelt sich hier um einen aktiven Prozess, ähnlich wie bei der Generierung von Knochenzellen (Owens et al., 2004).

Während der Atherogenese wird oft eine intimale Kalzifizierung beobachtet. Dieser Differenzierungs-Prozess, siehe Abbildung 1, ist vor allem ein Indikator der voranschreitenden Arteriosklerose mit Befall der Aorta, koronar Arterien und weiteren großen Arterien (Nitta et al., 2011; Johnson et al., 2006). Die kalzifizierte Region ist im Lipid-Kern des Atheromas und an Stellen der eingewanderten Leukozyten zu erkennen (Alkawa et al., 2007).

Diese „osteogene Transdifferenzierung“ der VSMCs wird durch folgende Faktoren ausgelöst: Durch Verlust des typischen VSMCs Phänotyps („kontraktil“) und der Zelldifferenzierung mit „synthetischen“ Merkmalen (Abb. 1 Punkt 1), sowie Seneszenz (Abb. 1 Punkt 2) oder Apoptose (Abb. 1 Punkt 3). Weitere wichtige Initiatoren sind osteogene Proteine, die durch diverse Aktivatoren und Inhibitoren reguliert werden.

Seneszens. Seneszente VSMC durchlaufen eine Phänotyp-Transformation in einen pro-kalzifizierenden/Osteoblast-ähnlichen Zustand (Burton et al., 2010). Dies kann durch IL-1 und TNF- α Stimulierung ausgelöst werden, wodurch es zur Expression von *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2) kommt. BMP-2 löst anschließend die Expression der Transkriptionsfaktoren *runx-related transcription factor-2* (Runx2) sowie *Msh homeobox 2* (Msx2) aus, die normalerweise für die Knochenbildung verantwortlich sind (Ciceri et al., 2012; Nitta et al., 2011). Dies treibt die osteogene Differenzierung voran (Ciceri et al., 2012).

Apoptose. Neben der Seneszenz spielt auch die Apoptose der VSMCs eine wichtige Rolle in der Kalzifizierung. Apoptotische Körperchen könnten demnach eine Anheftungsstelle für die Akkumulation von Lipoproteinen und Phospholipiden darstellen, an denen sich später Hydroxyapatit anlagert (Ossareh 2011). Desweiteren produzieren Makrophagen Kollagen, welches als Hydroxyapatit-Vorlage wirkt (Tyson et al., 2003).

Zelluläre Aktivatoren. Reguliert wird die vaskuläre Kalzifizierung durch Zytokine (IL-1, IL-6, TNF- α), Transkriptionsfaktoren (Cbf α 1, Runx2) und kalzifizierungsassoziierte Proteine

(*Bone morphogenetic proteins* (BMPs), Decorin, Alkalische Phosphatase (ALP)) (Abb. 1) (Burton et al., 2010).

Während der vaskulären Kalzifizierung ist die Expression von BMPs (BMP-2, -4, -6) am effektivsten, die innerhalb des arteriosklerotischen Plaques autokrin und parakrin auf VSMCs wirken (Nakagawa et al., 2010; Dhore et al., 2001; Schluesener et al., 1995). Die BMPs regulieren ihren Phänotyp, was sich auf Proliferation und Differenzierung dieser Zellen niederschlägt (Boström et al., 2011). BMP-2 wirkt inhibierend auf die Proliferation, wohingegen BMP-7 einen pro-proliferativen Effekt aufweist (Hruska et al., 2005). Die Zellen mineralisieren und erhalten eine verstärkte extrazelluläre Matrix (Boström et al., 2011). Reguliert wird die BMP-Expression durch das aktivierte Endothel, indem freigesetzter *tumor necrosis factor-α* (TNF-α), IL-1,-6, Hydrogenperoxid sowie ein erhöhter intravaskularen Druck als Stimuli wirken (Csiszar et al., 2005; Yao et al., 2009).

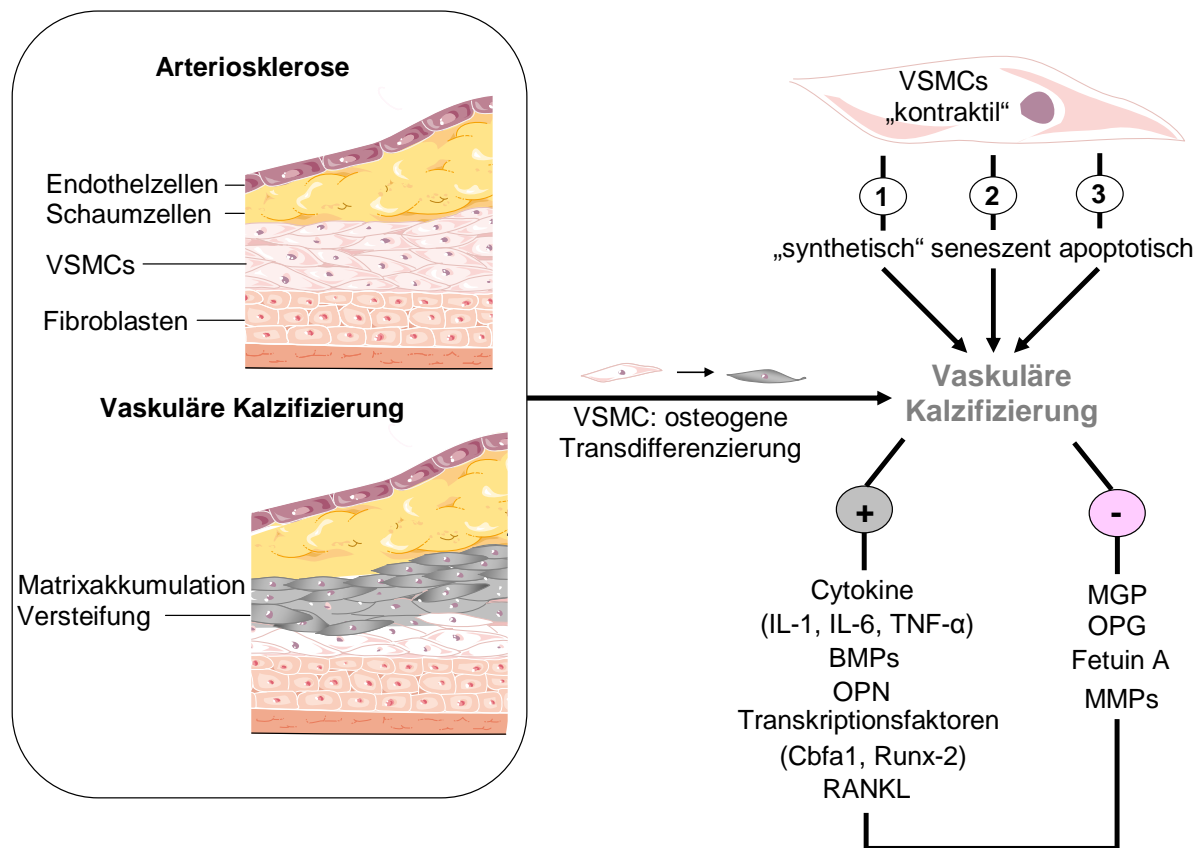


Abb. 1. Die arteriosklerotische intime Verkalkung. Bei der Arteriosklerose kommt es zur Neointima Bildung durch die Proliferation und Migration von VSMCs. Dies wird durch einen Phänotypveränderung (1), sowie Seneszens der VSMCs (2) oder Apoptose (3) begünstigt. Der Phänotyp der VSMCs ist außerdem wichtig für die Entstehung und Progression der Kalzifizierung, welcher durch osteogene Faktoren reguliert wird. Die Wirkung dieser osteogenen Faktoren, wie BMPs oder OPN werden durch diverse Inhibitoren wie MGP oder Fetuin A reguliert. Details siehe Text Kapitel 1.2.

Zelluläre Inhibitoren. Endothelzellen wirken dem entgegen, indem sie den Vitamin K-abhängigen Kalzifizierungsinhibitor Matrix-Gla-Protein (MGP) exprimieren, der inhibierend auf BMPs wirkt (Cola et al., 2004). Ein weiterer Kalzifizierungsinhibitor der VSMCs und Endothelzellen ist Osteoprotegerin (OPG). OPG wirkt als Antagonist von *receptor activator of nuclear factor κ B ligand* (RANKL). RANKL ist ein osteochondrogener Mineralisationsfaktor und wird nach Zytokin-Stimulierung in Makrophagen und T-Zellen exprimiert. Er wirkt auf VSMC in einen BMP4/RANK-abhängigen Signalweg (Panizo et al., 2009). OPG wirkt außerdem aktivitätssteigernd auf MMP9, die Einfluss auf die Plaques-Stabilität nehmen könnte (Bennett et al., 2006). Das α -2-Heremans-Schmid Glykoprotein Fetuin A ist ein weiterer Kalzifizierungsinhibitor der VSMCs, indem es amorphes Kalzium/Phosphat wegfängt und somit vor Apatit-Ansammlung schützt (Abb. 1) (Reynolds et al., 2005). MMPs sorgen für eine Degradierung der akkumulierten extrazellulären Matrix, und reduzieren dadurch die Versteifung der Zellen (Abb. 1) (Adiquzel et al., 2009).

In der Medizin werden zur Zeit diverse Therapien angewandt, um den Prozess der vaskulären Kalzifizierung zu verlangsamen. Reversibel ist diese Krankheit nicht. Es werden Kalzium-enthaltende Phosphat-Binder verabreicht, sowie hohe Dosen an Vitamin D, oder Coumadin, einen MGP-Inhibitor (Nitta et al., 2011).

Neben der Bekämpfung des gestörten Kalzium/Phosphat Verhältnis ist daher das Verständnis der Regulation von osteogenen Wachstumsfaktoren von hoher Priorität.

Zu den bisher bekannten Regulatoren gehören unter anderen einige plasmatische Proteasen. Seitdem bekannt ist, dass ein Einzelnukleotidpolymorphismus der Plasmaprotease Faktor VII-aktivierende Protease (FSAP) ein Risikofaktor der Arteriosklerose und vaskulären Kalzifizierung ist (Gardener et al., 2011, Zakai et al., 2011), liegt die Vermutung nahe, dass dieses Protein in vaskulären Remodellierungsvorgängen beteiligt ist. Das folgende Kapitel widmet sich daher der Struktur, Regulation, und den zellulären Effekten der FSAP.

1.3 Faktor VII-aktivierende Protease (FSAP)

Die Faktor VII-aktivierende Protease (FSAP) ist eine relativ neue zirkulierende Plasma Serinprotease, die erstmals von Choi-Miura und Mitarbeitern 1996 beschrieben wurde.

Eine Assoziation von FSAP mit der Entstehung und Progression von kardiovaskulären Erkrankungen wie Arteriosklerose und vaskuläre Kalzifizierung wird durch folgende Fakten belegt:

(1) Der FSAP Polymorphismus „Marburg I“ ist ein Risikofaktor von kardiovaskulären Erkrankungen wie Arteriosklerose und vaskulärer Kalzifizierung (Gardener et al., 2011).

- (2) Die FSAP wird von infiltrierten Monozyten exprimiert und ein gesteigertes Proteinlevel ist assoziiert in instabilen arteriosklerotischen Plaques (Parahuleva et al., 2008).
- (3) Die FSAP inhibiert *platelet derived growth factor*-BB (PDGF-BB) und inhibiert somit die Proliferation und Migration von VSMC (vaskuläre Remodellierung) (Kannemeier et al., 2004; Sedding et al., 2006).
- (4) Die FSAP inhibiert *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) und wirkt somit prothrombotisch (Kanase et al., 2012).
- (5) Die FSAP wird durch Zelltrümmer während der entzündlichen Phase aktiviert (Yamamichi et al., 2011; Stephan et al., 2011).
- (5) Die FSAP generiert die Anaphylatoxine C3a und C5a (Kanase et al., 2012).
- (6) FSAP Plasma Antigen und Proteinaktivität steigen nach multiplen Trauma an (Kanase et al., 2012).

Durch ihre breite Substratspezifität reguliert die FSAP auch verschiedenen Wachstumsfaktoren (Jeon et al., 2006; Kannemeier et al., 2004; Etscheid et al., 2004) sowie die Signaltransduktion über proteaseaktivierte Rezeptoren (PARs) (Mambetsariev et al., 2010). Die hohe Strukturhomologie zu Serinproteasen der Blutgerinnung und Fibrinolyse deutet außerdem auf eine regulatorische Funktion der Hämostase hin.

1.3.1 Die Struktur der FSAP

Die Proteinstruktur der FSAP zeigt starke Homologie mit uPA, Plasminogen, Faktor XII oder *hepatocyte growth factor activator* (HGF-A) auf (<http://www.treefam.org>).

Das translatierte Protein umfasst 560 Aminosäuren, inklusive eines 23 Aminosäuren langen Signalpeptides. Der Carboxy-Terminus des Proteins ist 30 kDa schwer (leichte Kette), und beinhaltet die katalytische Trypsin-ähnliche Serinproteasedomäne (Aminosäure 237-560). Das katalytische Zentrum der Serinprotease-Domäne wird von His³⁶², Asp⁴¹¹ und Ser⁵⁰⁹ gebildet. Der 48 kDa schwere N-terminale Teil, auch schwere Kette genannt, weist 3 *epidermal-growth-factor* (EGF) Domänen, sowie eine Kringledomäne auf (Abb. 2 oben) (www.uniprot.org)

Zur Proteinstabilität tragen 18 Disulfidbrücken bei, wobei eine dieser Disulfidbrücke die schwere mit der leichten Kette verknüpft (C³⁰¹ – C⁴³⁵). Posttranslationale Modifikationen der FSAP werden durch Protein-Glykosylierung hervorgerufen: es treten zwei N-glykosidische Bindungen bei Asn⁵⁴ und Asn²⁰⁷, sowie zwei O-glykosidische Bindungen bei Thr²⁸⁹ und Thr²⁹³ auf, die ein Molekulargewicht der FSAP von ~65-70 kDa hervorrufen, wobei 3,5 % des Gewichts auf die Glykosylierung zurückzuführen ist (Choi Miura et al., 1996; Kannemeier et al., 2001).

1.3.2 Regulation der FSAP Aktivität

Das inaktive FSAP-Zymogen wird von der Leber als einkettige Form in das Gefäßsystem sekretiert, wo es in einer Konzentration von 12 µg/ml zirkuliert. Wie bei vielen anderen Hämostase-Faktoren spielt die Bindung an geladenen Oberflächen auch bei FSAP eine wichtige Rolle bei der *autokatalytischen* Zymogenaktivierung.

Aktivierung durch Polyanione. Zu solchen negativ geladenen Oberflächenstrukturen gehören Polyanione, Mastzell-freigesetztes Heparin sowie Polyphosphate aus Plättchen (Muhl et al., 2009; Kannemeier et al., 2001). Weitere Kofaktoren sind Dextransulfat (Etscheid et al., 2000), Polyphosphatidylethanolamine (Choi-Miura et al., 2001), RNA (Kannemeier et al., 2004), DNA, Nukleosome (Stephan et al., 2011), Histone (Yamamichi et al., 2011) und apoptotische Körperchen (Nakazawa et al., 2005).

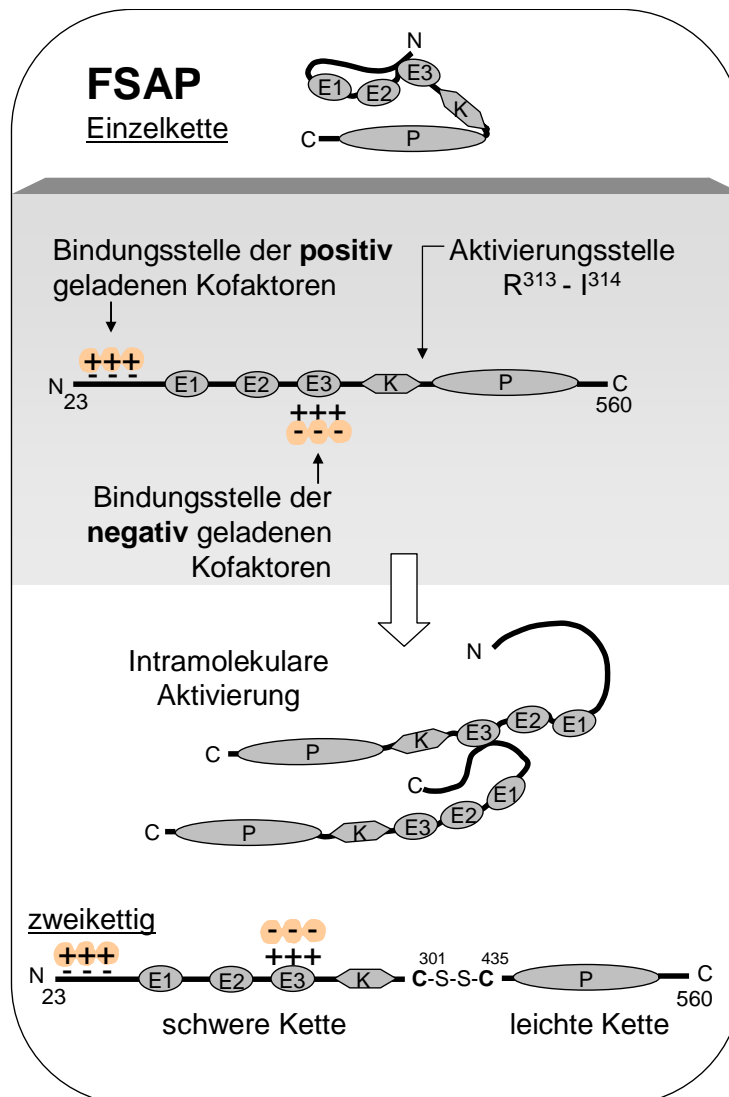
Für die Bindung der Polyanione an FSAP ist die EGF-3-Domäne aufgrund ihrer hohen Anzahl basischer Aminosäuren verantwortlich (Altincicek et al., 2006). Nach Bindung dieser Komponenten an die FSAP, wird die inaktive einkettige in eine aktive zweikettige Form überführt (Abb. 2). Die schwere Kette beinhaltet die 3 EGF- und die Kringle-Domäne, und die leichte Kette die katalytische Proteasedomäne. Die Spaltung erfolgt bei R³¹³-I³¹⁴ und beide Ketten werden durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke (C³⁰¹-C⁴³⁵) miteinander verknüpft (Choi-Miura et al., 2001). In Plasma oder Serum kann die inaktive FSAP durch den Kontakt mit apoptotischen Zellen aktiviert werden, wobei es zu einer Korrelation von aktivierter FSAP und Nukleosomen-Freisetzung kommt (Stephan et al., 2011).

Aktivierung durch Polykatione. Durch Studien zur Polykation-Bindung, beispielsweise Histone, Nukleosome oder Polyamine, wurde ein induzierter *intramolekularer* Aktivierungsmechanismus aufgedeckt (Abb. 2). Hier wurde der Amino-Terminusregion (NTR) eine Zymogen-stabilisierende Wirkung zugewiesen (Yamamichi et al., 2010). Dabei interagiert die NTR mit der EGF-3 Domäne, und *verhindert* eine autokatalytische Aktivierung. Nach der Bindung eines polykationischen Kofaktors kommt es zu der Aufhebung der NTR-EGF-3-Domänen Interaktion. Die NTR liegt wieder frei vor, und die *autokatalytische* Aktivierung wird durch Zymogen-Zymogen Bindung hervorgerufen (Abb. 3 unteres Bild) (Yamamichi et al., 2010). Dieser Mechanismus kann auch durch Polyanionbindung an die EGF-3 Domäne erfolgen.

Inhibierung. Im Plasma liegt die FSAP mit den Serinprotease Inhibitoren (SERPINE) C1-Inhibitor und α 2-Antiplasmin in Komplex vor (Stephan et al., 2011). Neueste Befunde weisen auch auf einen negativen Effekt des Kunitz-Typ-Inhibitors *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) auf die FSAP Aktivität hin (Stephan et al., 2012). Zu weiteren FSAP-Inhibitoren zählen α -1 Proteinase-Inhibitor, Aprotinin, Antithrombin, Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1) und Protease Nexin-1 (Abb. 2) (Romisch, 2002; Wygrecka et al., 2007; Muhl et al., 2007). Der Abbau des FSAP-Inhibitor-Komplexes erfolgt über die Bindung an *low-density lipoprotein receptor*

related protein (LRP) und den LRP-Rezeptor, der endozytotisch abgebaut wird (Muhl et al., 2007).

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die FSAP Aktivität durch verschiedene Faktoren bei der Plättchen-Aktivierung, Zellverletzung, Apoptose oder bei Entzündungen kontrolliert wird (McVey 2012). Die Aktivierung erfolgt demnach über einen intramolekularen Mechanismus und wird durch zahlreiche plasmatische Aktivatoren und Inhibitoren kontrolliert, die in Abbildung 2 zusammengefasst wurden.



Aktivatoren

- Heparin
- Polyphosphat
- Polyamine
- RNA
- DNA
- Histone
- Nukleosome
- apoptotische Körperchen
- Polykationen

Inhibitoren

- Aprotinin
- C1-Inhibitor
- TFPI
- α -1 Proteinase Inhibitor
- α 2 –Antiplasmin
- Antithrombin
- PAI-1
- Protease Nexin-1

Abb. 2. Struktur und Regulatoren der FSAP. Im Gefäßsystem wird das FSAP-Zymogen durch verschiedene Faktoren aktiviert. Die Aktivatoren (orange) können an kationische Regionen am FSAP N-Terminus bzw. an die EGF-3 Domäne, die eine Ansammlung basischer Aminosäuren enthält, binden. Nach der Bindung kommt es zu einem Autoaktivierungsprozess, in der die inaktive einkettige Form nach Spaltung bei Position R³¹³-I³¹⁴ in eine zweikettige aktive Form überführt wird. Die schwere und die leichte Kette bleiben jedoch über eine Disulfidbrücke (C³⁰¹-C⁴³⁵) miteinander verbunden. Der intramolekulare Aktivierungsmechanismus der FSAP setzt die Bindung der Kofaktoren voraus, die zu einer Freilassung der EGF-3 Domäne vom N-Terminus führt. E= EGF-Domäne; K= Kringle-Domäne; P= Proteasedomäne

Bei Betrachtung dieser Mechanismen der Aktivitätskontrolle stellt sich die Frage, welche Rolle FSAP unter diesen Bedingungen (Apoptose, Entzündung) zu Teil wird. Daher liegt die Vermutung nahe, dass FSAP bei der vaskulären Reparatur beteiligt sein könnte.

1.3.3 FSAP als kardiovaskulärer Risikofaktor

Ein Einzelnukleotidpolymorphismus der FSAP (rs7080536) mit dem Titel „Marburg I“ ist assoziiert mit allgemeinen Herz- Kreislauf-Erkrankungen (Ireland et al., 2004), venösem Thromboembolismus (Ahmad-Nejad et al., 2012; Hoppe et al., 2005; Gulesserian et al., 2006), Schlaganfall Karotisstenose sowie (Hanson et al., 2012; Willeit et al., 2003; Trompet et al., 2011). Neueste Befunde beschreiben Marburg I als einen Risikofaktor der vaskulären Kalzifizierung sowie Arteriosklerose (Kapitel 1.2 und 1.3) (Trompet et al., 2011; Gardener et al., 2011; Zakai et al., 2011). Diese Daten sprechen für eine wichtige Rolle vom FSAP Protein und der vaskulären Integrität.

Der Einzelnukleotidpolymorphismus auf dem FSAP-Gen führt nach Protein-Translation zu dem Aminosäureaustausch von Glyzin zu Glutamat. Dies findet bei Position 534 des FSAP Proteins innerhalb der katalytischen Proteasedomäne statt. Der SNP wurde nach dem Entdeckungsort in Marburg „Marburg I“ genannt. Etwa 5 % der westeuropäischen Bevölkerung ist Träger dieser Genvariante. Marburg I Protein ist durch eine 50-80 % reduzierte Enzymaktivität im Vergleich zu Wildtyp FSAP hinsichtlich der pro-Urokinase Aktivierung (als FSAP Substrat) charakterisiert (Roemisch et al., 2002). Desweiteren konnte durch Aktivitätstests gezeigt werden, dass keine Marburg I induzierte Spaltung von FVII vorliegt (Kanse et al., 2012). Auch die Eigenschaft von Wildtyp FSAP, TFPI zu spalten, war bei der Marburg I Variante nicht vorzufinden (siehe Kapitel 3.4) (Kanse et al., 2012). Die reduzierte proteolytische Aktivität ist jedoch nicht von der Bindung an den Kofaktor Heparin abhängig, da eine Bindungsstudie mit isolierten Wildtyp und Marburg I FSAP keine Unterschiede in der Affinität zeigte (Sedding et al., 2006).

Es bleibt daher zu untersuchen, ob der Aminosäureaustausch zu einem stöchiometrischen Umbau innerhalb der Proteasedomäne führt, oder das veränderte elektrostatische Potenzial die Ligandenbindung beeinträchtigt.

Durch die reduzierte pro-uPA-aktivierende Funktion wird dem Marburg I Protein eine gesteigerte pro-koagulatorische bzw. pro-thrombotische Eigenschaft zugeschrieben. Dies stimmt auch mit der *in vitro* Beobachtung überein, dass MI-FSAP nicht den *tissue factor* Inhibitor TFPI degradiert (Kanse et al., 2012).

Die FSAP Proteinaktivität ist auch mit der Entstehung von Leberfibrose assoziiert. Auch hier schlägt sich die Marburg I Variante negativ auf die Krankheitsentwicklung nieder (Wasmuth et al., 2009). Wegen den oben genannten Risikofaktoren wurde ein PCR-basierender DNA-Test etabliert,

der den Marburg I SNP bei Patienten nachweisen kann (Tag et al., 2007). Demnach könnte zukünftig die Marburg I Variante sowie Plasma FSAP-Antigengehalt und Aktivität als Biomarker bei Herz- Kreislauf Erkrankungen genutzt werden.

Da die FSAP Proteinaktivität von physiologischer Bedeutung und deren Defekt mit diversen Krankheiten assoziiert ist, ist die Regulation der FSAP Aktivität und deren Wirkung auf diverse Zelltypen von großem Interesse.

1.3.4 Funktionen der FSAP

Wie im Kapitel 1.3.2 bereits beschrieben, wird die FSAP Proteinaktivität durch diverse Faktoren reguliert. Dies weist auf eine kontrollierte Substratbindung und Spaltung hin.

Während ihrer Entdeckung wurde FSAP eine FVII-aktivierende Funktion zugeschrieben, und somit als pro-koagulatorischer Faktor charakterisiert (Römisch et al., 1999). Diese direkte Rolle der FSAP in der Hämostase wird durch neueste Befunde jedoch immer unwahrscheinlicher.

FVII ist nur ein sehr schwaches Substrat (EC_{50} : 100nM) der Wildtyp FSAP, des Weiteren findet keine FVII-Aktivierung durch die MI-Variante der FSAP statt (Kanse et al., 2012). Dieser Befund fand Einklang mit der Beobachtung von Stavenuiter et al., 2012.

Jedoch identifizierten Kanse und Mitarbeiter 2012 TFPI als neues Substrat für FSAP (EC_{50} : 3 nM). Die pro-koagulatorische Funktion von FSAP wird demnach durch die Initiierung des TF-abhängigen Gerinnungsweges ausgelöst, indem dessen Inhibitor TFPI durch FSAP degradiert wird (Kanse et al., 2012). Eine Vergleichsstudie mit weiteren Hämostasefaktoren konnte zeigen, dass FSAP TFPI effektiver inhibiert als Plasmin, Thrombin und FXa, jedoch weniger effizient als Elastase und APC. Demnach übt FSAP einen Effekt auf TF-exprimierende Zellen aus, indem es dessen Inhibitor degradiert. Dadurch wird FSAP zu einen indirekten pro-koagulatorischen, sowie pro-inflammatorischen Regulator diverser vaskulärer Zellen (Kapitel 2.0). Diese Daten stehen im Kontrast zu den neuen Befunden von Stephan und Mitarbeiter, die TFPI als Inhibitor der FSAP identifiziert haben. Hier wurde spekuliert, dass TFPI den pro-inflammatorischen Effekt der FSAP als Nukleosom- und Histon-Freilassungsfaktor abschwächt, und somit während Entzündungen protektiv wirken könnte (Stephan et al., 2012; Zeerleder et al., 2008; Zeerleder et al., 2007). Da die TFPI-Konzentration im Plasma jedoch sehr gering ist (~89 ng/ml; Lindahl 1997), ist die inhibitorische Funktion nicht sehr bedeutsam.

Nach multiplem Trauma steigt FSAP-Antigenkonzentration und -Aktivität im Plasma deutlich an (Kanse et al., 2012). Auch bei Sepsis-Patienten oder *Meningococcal sepsis*-Infektionen steigt die FSAP-Konzentration und wird bei Entzündungen in Komplex mit Histonen, Nukleosomen oder apoptotischen Körperchen detektiert (Stephan et al., 2012; Kanse et al., 2012; Yamamichi et al., 2011). Diese negativ geladenen Strukturen sind auch für die oberflächeninduzierte Aktivierung

der FSAP verantwortlich (Kapitel 1.3.2). Durch die Spaltung und Generierung der Anaphylatoxine C3a/C5a kann FSAP eine modulatorische Funktion innerhalb der Immunantwort zugeschrieben werden (Kanse et al., 2012).

Neben der Rolle der FSAP als pro-koagulatorischer sowie entzündungsmodulatorischer Faktor ist FSAP auch an vaskulären Remodellierungsprozessen beteiligt. Hier wird FSAP eine protektive Funktion zugeschrieben. Der Einfluss der FSAP auf Wachstumsfaktoren soll im folgenden Kapitel veranschaulicht werden.

1.3.5 FSAP-Interaktion mit Wachstumsfaktoren

Da FSAP ein protektiver Einfluss auf die Remodellierung des defekten Gefäßes zugeschrieben wird (FSAP vs. Marburg I Kapitel 1.3.3), liegt die Vermutung nahe, dass es hier zu einer Protein-Interaktion mit Wachstumsfaktoren kommen könnte. Zahlreiche vaskuläre Wachstumsfaktoren sind für die Proliferation und Migration von Endothel- und vaskulären glatten Muskelzellen zuständig. Diese Vorgänge sind beispielsweise bei der Angiogenese oder Arteriosklerose bedeutsam (Valluru et al., 2011).

Unter pathophysiologischen Bedingungen kommt es zur Plättchenaggregation sowie Degranulierung. Zu den Komponenten dieser Granula gehören Polyphosphate sowie diverse Wachstumsfaktoren, die lokal auf das entzündete Gefäß, sowie chemotaktisch auf die Rekrutierung von Neutrophilen und Makrophagen wirken (Schultz 2007). Wie bereits in Kapitel 1.3.2 beschrieben, kann FSAP durch Polyphosphate aktiviert werden (Muhl et al., 2009). Eine Interaktion der aktivierten FSAP mit Plättchen sezernierten Wachstumsfaktoren (PDGF-BB, VEGF, EGF, TGF- β und bFGF) galt daher als Untersuchungspunkt.

bFGF/ FGF. FSAP spaltet und inhibiert freies endotheliales bFGF/FGF-2 (Etscheid et al., 2004). Interessanterweise war unfreies bFGF, an Glykosaminoglykan (GAG) gebunden, vor FSAP-Spaltung und Inhibierung geschützt (Etscheid et al., 2008). Jedoch kann FSAP die GAG-Ketten spalten, und somit bFGF zur freien biologischen Verfügbarkeit verhelfen. Dies hat die Aktivierung des FGF-Rezeptors und Induktion des intrazellulären ERK1/2-Signalwegs zur Folge (Etscheid et al., 2005; Kress et al., 2006). Etscheid und Mitarbeiter diskutierten, dass diese Befunde einen möglichen physiologischen Einfluss auf die Neovaskularisierung und der Gewebmodellierung haben könnten (Etscheid et al., 2008).

VEGF. Exogene FSAP führte zu einer Inhibierung des Cystein-Knoten Proteins VEGF und einem anti-Angiogenese-Effekt in *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) (Jeon et al., 2006).

In einer komparativen Bindungsstudie von FSAP an PDGF-BB, VEGF, bFGF, PDGF-AA und EGF zeigte sich, dass immobilisierte FSAP die höchste Affinität zu PDGF-BB aufweist (Etscheid

et al., 2006). EGF zeigt keine Bindung, und PDGF-AA im Gegensatz zu strukturell verwandten PDGF-BB (ca. 60 % Sequenz Homologie) besitzt eine nur sehr geringe Bindungsaffinität (Etscheid et al., 2006).

PDGF-BB. Am ausführlichsten wurde bisher der Einfluss von FSAP auf das Cystein-Knoten Familienmitglied PDGF-B untersucht. Der dimere Wachstumsfaktor PDGF-BB wird zum einen von Plättchen ins Gefäßsystem sezerniert, zum anderen von eingewanderten Makrophagen in die entzündete Gefäßwand importiert. PDGF-BB ist bei der Arteriosklerose an der Neointima-Bildung beteiligt (Dzau et al., 2002; Dong et al., 2010). Der PDGF-induzierte Signalweg wird über die membranständigen PDGF-Rezeptoren PDGFR α und PDGFR β vermittelt (Heldin et al., 1991).

Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass FSAP den aktiven Homodimer von PDGF-BB in seine monomere Form spaltet und somit PDGF-B inaktiviert (Kannemeier et al., 2004). Dieser Effekt war von der proteolytischen Aktivität von FSAP abhängig, da die Marburg I Variante mit reduzierter Proteaseaktivität deutlich weniger Effekte aufwies (Sedding et al., 2006). Weitere Untersuchungen ergaben, dass FSAP PDGF-BB in der *loopIII*-Region außerhalb des Cystein-Knoten spaltet (Shibamiya et al., 2007).

Diese Interaktion hatte *in vivo* in einem Mausmodell zur Neointima-Bildung deutliche Auswirkungen: Nach Zugabe von exogener FSAP war die Proliferation und Migration der VSMCs stark reduziert, was zu geringer Neointima-Bildung führte (Sedding et al., 2006). FSAP gilt demnach als Protektor der VSMC induzierten Neointima-Bildung. Diese Hypothese stimmt mit der Beobachtung überein, dass Marburg I-SNP-Träger ein höheres Risiko tragen, Gefäßerkrankungen zu erleiden (Kapitel 1.3.3) (Willeit et al., 2003; Ireland et al., 2004).

Da das FSAP-Antigen bei instabilen arteriosklerotischen Plaques detektiert wurde (Kapitel 1.3), liegt die Vermutung nahe, dass proteolytisch aktive FSAP die Stabilität des Plaques beeinflussen könnte (Kannemeier et al., 2004; Kanse et al., 2008). Es wird angenommen, dass zum einen zirkulierende FSAP, zum anderen Makrophagen-exprimierte FSAP über Infiltration in das Gewebe aufgenommen wird (Parahuleva et al., 2008).

Es bleibt als weiterer Untersuchungspunkt, inwiefern FSAP die Plaque-Bildung und Stabilität beeinflusst. Daher soll die Interaktion mit weiteren Cystein-Knoten Familienmitgliedern untersucht werden, die ebenfalls die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen regulieren können. Die TGF- β Superfamilie beinhaltet Wachstumsfaktoren, die strukturelle Homologie zu PDGF-Proteinen anhand ihrer Cystein-Knoten-Struktur aufweisen. Diese Wachstumsfaktoren üben wichtige Funktionen in der Proliferation und Differenzierung unterschiedlichster Zelltypen aus.

1.4 Die *Transforming growth factor-β* Superfamilie

Die TGF- β Superfamilie fasst strukturell ähnliche sekretierte Peptide zusammen. Zu diesen Cystein-Knoten Proteinen gehören 33 Mitglieder in Säugetieren. Die Analyse dieser Wachstumsfaktoren ist von enormer medizinischer Bedeutung, da Defizite im adulten Organismus zu schwerliegenden Krankheiten wie Gefäßerkrankungen, pulmonaren Bluthochdruck, Fibrose, Krebs und Muskel-/Skelettdeformationen führen können. Desweiteren sind die Wachstumsfaktoren bei der Embryonalentwicklung und Organogenese essentiell (Horbelt et al., 2012).

Ein strukturelles Merkmal der TGF- β Superfamilien Mitglieder ist der Cystein-Knoten, der aus einen Ring von 6 ausgebildeten Disulfidbrücken durch 12 Cysteinen gebildet wird. Die Polypeptidkette zwischen Cystein 1-2 sowie Cystein 5-6 weist eine β -Faltblatt Struktur auf, die Sequenz zwischen Cystein 3-4 ist als α -Helix angeordnet (Innis et al., 2000). Eine weitere Disulfidbrücke erstreckt sich durch diese Schlaufe (Daly and Craik 2011). Diese Cysteine sind streng konserviert zwischen den Cystein-Knoten Proteinen (beispielsweise PDGF, NGF, TGF- β , BMP-2/4/7 und GDF-5) (Murray-Rust et al., 1993).

Unterschieden wird wie in Abbildung 3 zusammengefasst zwischen den Subfamilien TGF- β , Activin, Inhibin, Nodal, Myostatin, *Müllerian-inhibiting substance* (MIS), und den BMPs (Hogan 1996, Reddi 1998, Moustakas and Heldin 2009).

Eines der bekanntesten Mitglied ist TGF- β -1, der für seine Tumorsuppressor-Funktion bekannt ist. Er induziert ein Anhalten des Zellzyklus und leitet die Apoptose ein (Massague 2008). Während der späten Tumorgenese wirkt sich TGF- β positiv auf die Metastasenbildung und Neoangiogenese aus. Desweiteren hat TGF- β eine wichtige Funktion in der Einleitung der „Epithel-zu-Mesenchymal-Transition“ (EMT). Auch eine Wirkung auf Fibroblasten wurde durch deren Transformation in Myofibroblasten identifiziert. Dabei führt TGF- β Stimulierung zu verstärkter extrazellulärer Matrix-Akkumulation der Zellen, was auch mit fibrotischen Krankheiten in Korrelation steht (Miyazono 2009).

Die BMP-Familie ist die größte Unterfamilie der TGF- β Superfamilie. Die BMP-Familie wird in folgende Unterfamilien unterteilt: die BMPs, die *osteogenic proteins* (OPs), die *cartilage-derived morphogenetic proteins* (CDMPs) und *Growth and differentiation Factors* (GDF) (Abb. 3) (Derynck and Miyazono 2007).

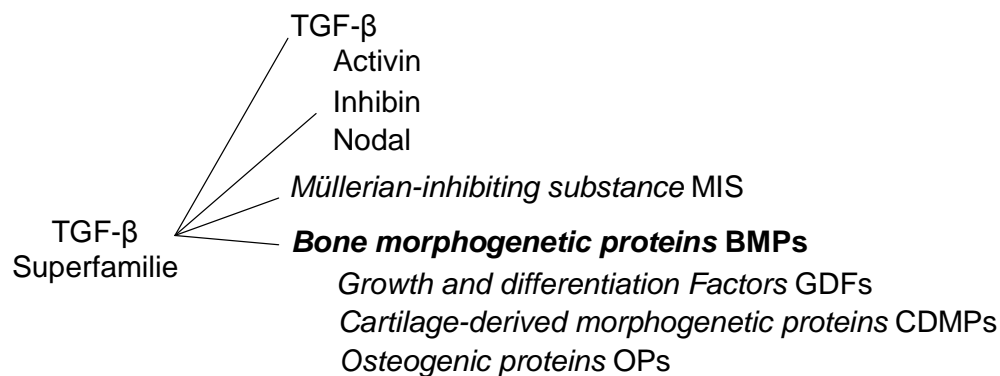


Abb. 3. Die Mitglieder der TGF-β Superfamilie.

Unter den GDF-Wachstumsfaktoren ist GDF-5 in Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen hervorzuheben. GDF-5 ist nach Myokardinfarkt ein protektiver Reparatur- und Remodellierungsfaktor, der die Entstehung des Narbengewebe reduzieren kann (Zaidi et al., 2010). Eine besondere vaskuläre Bedeutung haben außerdem die BMPs -2, -4, -6 und -7. Sie spielen im Blutgefäßsystem eine wichtige Remodellierungsrolle, beispielsweise bei Angiogenese, vaskuläre Kalzifizierung sowie bei endothelialer Entzündung (Derwall et al., 2012; Helbing et al., 2011; Bobik 2006). Die biologische Wirksamkeit der *Bone morphogenetic protein* Familie soll im nächsten Kapitel vorgestellt werden.

1.4.1 Funktion und Regulation der *Bone morphogenetic proteins* (BMPs)

Alle BMPs werden als große Präproproteine synthetisiert, mit einer Länge von 400-500 Aminosäuren. Die Polypeptidkette besteht aus einem N-terminalen Signalpeptid zur Sekretion, einer Prodomäne, sowie dem C-terminalen reifen Peptid mit dem Cystein-Knoten (Xiao et al., 2007; Sieber et al., 2009).

BMP Assemblierung. Latente pro-BMPs können im Zytoplasma über Bindung der Prodomäne dimerisieren und anschließend proteolytisch gespalten werden. Die Spaltung der Prodomäne wird durch das konservierte Sequenzmotif R-X-X-R (X entspricht einer beliebigen Aminosäure) von Serinendoproteasen im Zuge von posttranslationalen Modifikationen im Golgi-Netzwerk durchgeführt (Kapitel 1.4.2 Abb. 7) (Constam and Robertson 1999). Nach Spaltung der Prodomäne wird der Dimer durch die Cystein-Knoten Struktur kovalent verknüpft, indem eine vierte Disulfidbrücke intramolekular beide Peptide stabilisiert (Nohe et al., 2004). Heterodimere (BMP2/4, BMP2/6, BMP2/7 und BMP4/7) führen zu einer gesteigerten biologischen Aktivität (Abb. 4 oben) (Guo and Wu 2012; Sieber et al., 2009, Little and Mullins, 2009, Israel et al., 1996).

Rezeptoren. Nach der Sekretion wirken BMPs im Extrazellularraum über Gradienten (Harrison et al., 2011). Über ihre Amino-terminale heparinbindende Domäne wird die Anheftung

an Proteoglykane der extrazellulären Matrix vermittelt (Ruppert et al., 1996). Ihre biologische Wirkung wird über BMP-Rezeptoren initiiert. Bei den BMP-Rezeptoren handelt es sich um Transmembran-Serin/Threonin Kinase-Rezeptoren (Massague and Weis-Garcia, 1996). Die BMP-Rezeptoren werden unterschieden in zwei Klassen, den TypI (BRI) Rezeptoren und den TypII (BRII) Rezeptoren. Bisher sind 5 BRI-Rezeptoren, sogenannte *activin receptor-like kinases* (ALK), bekannt: ALK1 (Acvrl1), ALK2 (ActRI), ALK3 (BRIa), ALK4 (ActRIb) und ALK6 (BRIb) (Ehrlich et al., 2011). Zu den BRII Rezeptoren zählen die Aktivinrezeptoren (Act): BRII, ActRIIa, und ActRIIb (Abb. 4) (Nohe et al., 2004).

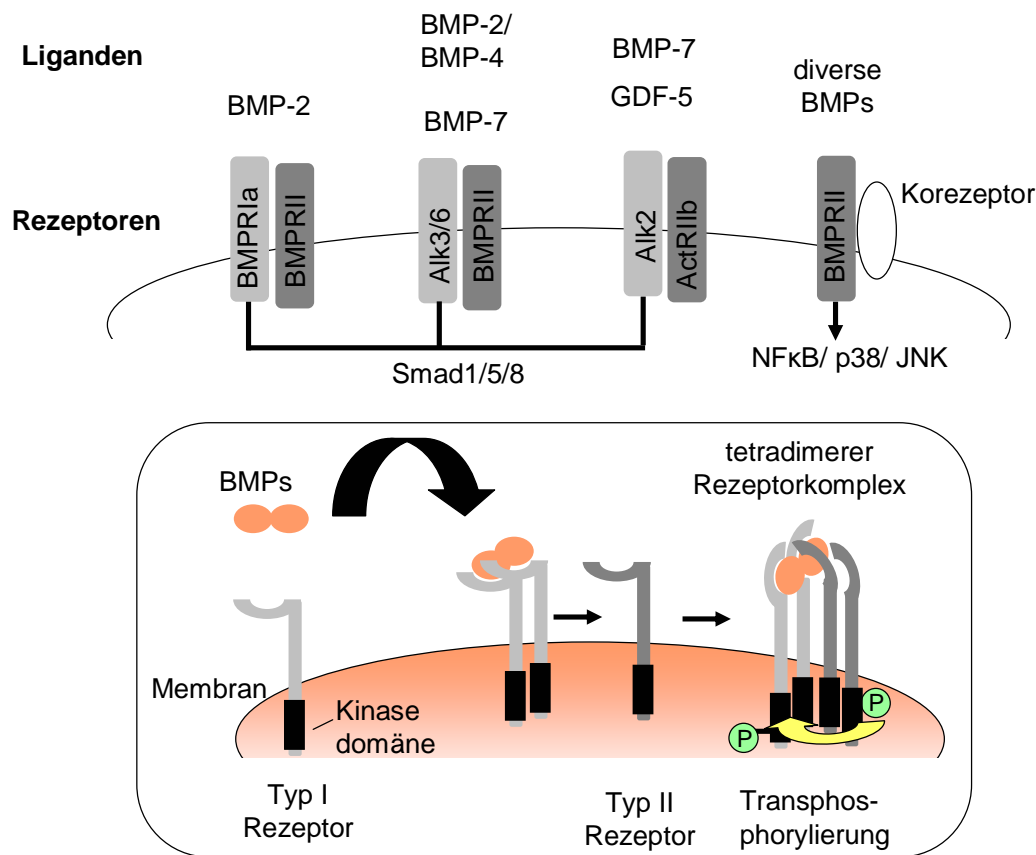


Abb. 4. BMP-Rezeptoren und ihre Liganden. Oberes Bild: BMP-Liganden weisen unterschiedliche Affinitäten zu den TypI und TypII Rezeptoren auf. BMPs können als Monomer, Dimer oder Heterodimer binden. Verschiedene Signalwege (Smad abhängig und auch unabhängig) sind je nach Rezeptorassembly (tetradimerer Komplex) möglich. Unteres Bild: Ligandenbindung führt zum Zusammenbau des tetradimeren Rezeptorkomplexes, gefolgt von Konformationsänderung und Transphosphorylierung des TypI Rezeptors durch TypII Rezeptor. Aktivierter TypI Rezeptor phosphoryliert anschließend seine Bindepartner (Smads) am zytoplasmatischen Teil.

Ligandenbindung. Die Affinität der Rezeptoren zur Ligandenbindung ist unterschiedlich, so weisen die meisten BMPs (z.B. BMP-2 und BMP-4) eine stärkere Affinität zu BRI auf als zu BRII (Allendorph et al., 2006, Kirsch et al., 2000). Die BMPs können sowohl als Monomer, sowie auch als Dimer an das Rezeptor-Epitop der BRI binden, wonach es zu einer Rekrutierung weiterer BMP-Rezeptoren (heterodimerer Komplex) kommt (Abb. 4 unteres Bild) (Allendorph et al.,

2006). Die Ligandenbindung findet über eine konservierte Sequenz der BMPs innerhalb des Cystein-Knotens zwischen Cystein 1 und 2 statt (Avsian-Kretchmer and Hsueh, 2004). Der Rezeptor-Kontakt wird über das BMP-Motif G/K-W-X_{1/2}-W-I/V-I/V-A/S-P vermittelt, wobei X einen beliebigen Rest darstellt (Allendorph et al., 2006). Glykosylierungen, als posttranslationale Modifikation, variieren die Rezeptoraffinität der BMPs. N-Glykosylierung wurde bei BMP-6 als wichtiger Faktor zur Rezeptor-Bindung (BRI) identifiziert (Saremba et al., 2008).

Signaltransduktion. Nach Bindung des Liganden kommt es zu einer Transphosphorylierung des TypI Rezeptors durch den aktivierten TypII Rezeptor (Abb. 5 Punkt 3). Die Phosphorylierung findet am Serin/Threonin-Rest der „GS-box“ am N-Terminus der intrazellulären Kinase-Domäne des Typ I-Rezeptors statt. Es kommt zu einer Substrat-Phosphorylierung der Smads am konservierten Motif S-S-X-S innerhalb des Carboxy-Terminus (Shi et al., 1998). Dies führt zu einer Aktivierung und Oligomerisierung von regulatorischen Smads (Smad1/5/8), die anschließend im Nukleus als Transkriptionsfaktoren wirken (Shi et al., 1998). Im Nukleus wirken die regulatorischen Smads im Komplex mit Smad4 als Transkriptionsfaktoren und binden direkt an *SMAD binding elements* (SBE) der DNA oder interagieren mit weiteren Transkriptionsfaktoren und Histon-modifizierenden Faktoren (Ross and Hill 2008).

Neben diesen Smad1/5/8 Signalweg gibt es auch diverse Smad-unabhängige Signalwege. Bereits untersucht ist der Signalweg über *TGF-β activated kinase 1* (TAK1) (Jadrich et al., 2006) oder die über BMPRII induzierte C-Terminale Aktivierung von LIMK1 (Foletta et al., 2003, Chan et al., 2007). Diese alternativen Signalkaskaden erstrecken sich über *extracellular-signal regulated kinase* (Erk), *p38 mitogen-activated protein kinase* (p38 MAPK), c-jun N-terminale Kinase (JNK), Phosphatidyl-3-Kinase (P13K/Akt) oder Src und Rho GTPase-Aktivierung (Moustakas and Heldin 2005; Derynck and Zhang 2003; Kardassis et al., 2009).

Zielgene. Bei den BMP-Zielgenen handelt es sich um Gene des Zellzyklus (Id1, p21) und der Transdifferenzierung (ALP, Runx2, Osterix, Osteopontin, Osteocalcin) sowie angiogene Wachstumsfaktoren wie VEGF-A (Hayashi et al., 2008; Lopez-Rovira et al., 2001). Im vaskulären System ist die BMP-induzierte Expression von VEGF-A wichtig für die Proliferation und Migration von Endothelzellen (Suzuki et al., 2008). Ein negativer BMP-Regulationsmechanismus erfolgt in vielen Zelltypen über die Expression der inhibitorischen Smads 6/-7 (Wrighton et al., 2009).

Regulation des BMP-Signalweges. Ligandengebundene BMP-Rezeptoren können über Caveolae-vermittelte Endozytose abgebaut und im Proteasom degradiert werden (Hartung et al., 2006). Desweiteren sorgen inhibitorische Smads (Smad6,-7) sowie die Smad Ubiquitin Ligasen SMURF1, -2 für eine Signalaufhebung (Wrighton et al., 2009). Eine zytoplasmatische Dephosphorylierung des BMP-RI führt zu einer Inhibierung der rSMADs (Abb. 5 Punkt 5). Im

Nukleus sorgen die Phosphatasen Ppm1A und Scp1-3 zu einer regulatorischen Smad-Dephosphorylierung (Wrighton et al., 2009).

Die BMP-Rezeptoren können auch mit Korezeptoren reguliert werden. Dazu gehören Betaglycan/TGF β R3 (Barbara et al., 1999), Endoglin/CD105 (Babitt et al., 2005), RGMa/RGMb (DRAGON) (Samad et al., 2005), RGMc/Hemojuvelin (Halbrooks et al., 2007), TRKC und ROR2 (Jin et al., 2007) (Abb. 5) Als negativ wirkender Pseudorezeptor wurde *BMP and Activin membrane-bound inhibitor* BAMBI identifiziert (Abb. 5) (Onichtchouk, D. et al., 1999).

Lösliche Inhibitoren. Die BMP Aktivität wird vor allem durch extrazelluläre lösliche Inhibitoren kontrolliert. Dazu zählen Noggin (Groppe et al., 2003), Follistatin (Sylva et al., 2011), Cerberus (Piccolo et al., 1999), Chordin (Fujisawa et al., 2009), Dan (Dionne et al., 2001), Gremlin (Sneddon et al., 2006), Sclerostin (Veverka et al., 2009) *twisted gastrulation* (Tsg) (Ross et al., 2001) und *tumor-necrosis factor induced protein-6* (TSG-6) (Mahoney et al., 2008). Ein weiterer vaskulärer BMP-Regulator ist *BMP endothelial cell precursor-derived regulator* (BMPER), der die BMP-4 Aktivität konzentrationsabhängig steigern oder inhibieren kann (Abb. 5) (Kelley et al., 2009). Im Endothelium vermag BMPER die BMP Aktivität zu kontrollieren und dadurch Einfluss auf den proinflammatorischen Phänotyp des Endothels zu nehmen (Helbing et al., 2011). Der pro-inflammatorische Effekt des BMP-Signalwegs wurde mit verstärkter NF κ B-Aktivität sowie Leukozyten-Adhäsion und -Migration in Verbindung gebracht (Helbing et al., 2011).

Nachdem im vergangenen Abschnitt die Funktion und Regulation der reifen, aktiven BMP Peptide diskutiert wurde, wird im folgenden Kapitel die Prozessierung der unreifen Proformen vorgestellt.

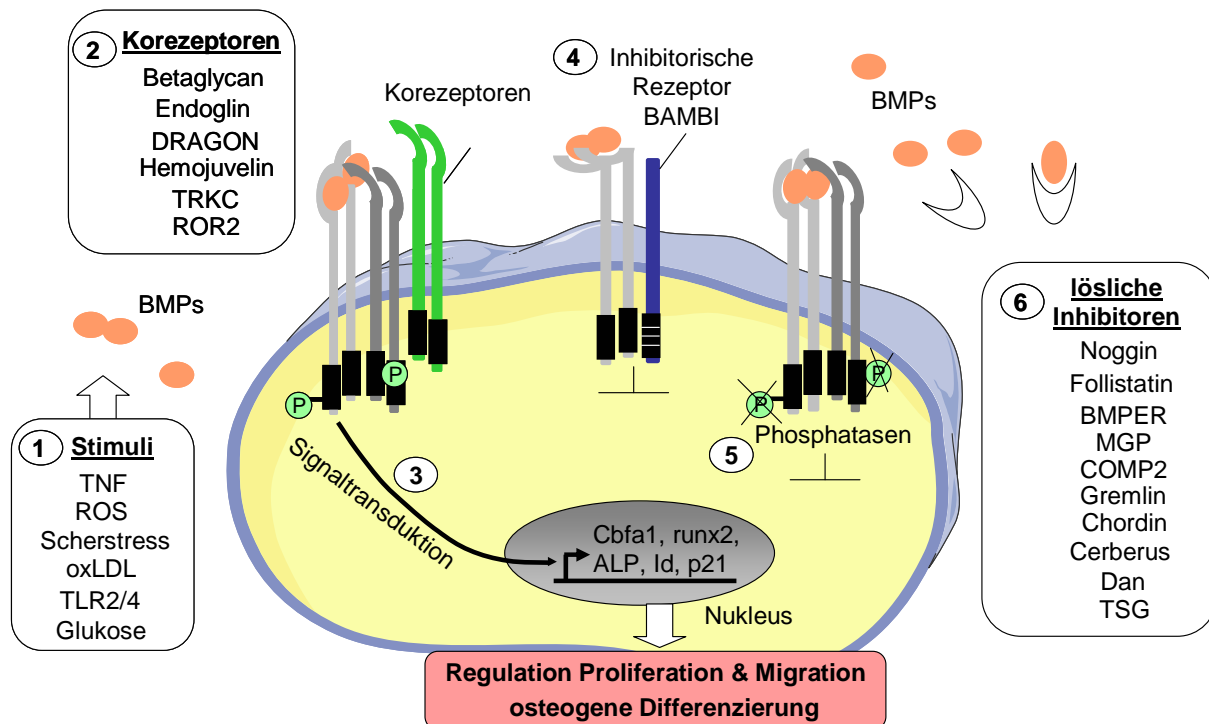


Abb. 5. Intrazelluläre und extrazelluläre BMP Regulation. (1) Die Expression der BMPs wird durch diverse Faktoren induziert. (2) Sekretierte BMPs können durch den herkömmlichen tetradimeren Rezeptorkomplex wirken, oder in Kombination mit Korezeptoren. (3) Korezeptoren wirken verstärkend auf die weitere Signaltransduktion und Induktion der BMP-Zielgene. (4) Im Gegensatz dazu wirkt der inhibitorische Rezeptor BAMBI im Rezeptorkomplex negativ. (5) Durch intrazelluläre Phosphatasen im Zytoplasma sowie im Nukleus wird der BMP-Signalweg kontrolliert. (6) Diverse lösliche Inhibitoren kontrollieren die BMPs durch direkte Bindung und regulieren somit den Zugang zum Rezeptor.

1.4.2 Bedeutung und Regulation der Prodomäne

Von besonderem Interesse ist die bisher unbekannte Funktion der großen Prodomäne der TGF- β Superfamilien-Mitglieder. Die Größe der Prodomäne variiert zwischen den einzelnen Mitgliedern und auch die Aminosäuresequenz ist sehr heterogen und ist lediglich zu ~15 % identisch (Harrison et al., 2011). Charakteristisch sind jedoch die konservierten Strukturelemente wie β -Faltblatt und α -Helix aller Prodomänen, die auf eine gemeinsame Funktion hindeuten (Harrison et al., 2011). Der Prodomäne wird eine wichtige Rolle in der Proteinfaltung, Regulation der freien biologischen Verfügbarkeit sowie Regulation der Aktivität zugewiesen.

Proteinfaltung. Es wird angenommen, dass die Prodomäne als *intramolekulares Chaperon* wirkt, um beispielsweise die komplexe Struktur des Cystein-Knotens zu stabilisieren. Dies wurde bereits bei dem Proprotein des *nerve growth factors* (pro-NGF) beobachtet (Rattenholl et al., 2001). Diese These des kotranslationalen intramolekularen Chaperons wurde erstmals Ende der 1980er Jahre für die Proteasen Subtilisin E (Ikemura et al., 1987), α -lytische Protease (Silen et al., 1989) sowie Carboxypeptidase Y (Winther and Sorensen 1991) beschrieben.

Die Faltung durch intramolekulare Chaperone birgt Vorteile: es handelt sich um hochspezifische Faltungshelfer, die im Gegensatz zu molekularen Chaperonen keine Energie in Form von ATP-

Hydrolyse benötigen. Die Prodomäne reduziert sogar die Aktivierungsenergie indem sie ein Faltungsintermediat (*molten globule*) herstellt, und somit die nötige Energie um das final gefaltete Endprodukt zu erreichen, reduziert (Shinde and Inouye 1993).

Intrazelluläre Spaltung der Prodomäne. Es wird angenommen, dass die Prodomäne durch postrtranslationale Modifikation gespalten wird. Untersuchungen von pro-BMP-1 (Leighton and Kadler, 2003), pro-BMP-2 (Heng et al., 2010), pro-BMP-4 (Cui et al., 1998), pro-GDF-5 (Thomas et al., 2006), pro-GDF-11 (Essalmani et al., 2008), und pro-TGF- β -1 (Dubois et al., 1995) belegten eine Prozessierung durch die Proproteinkonvertasen Furin bzw. Subtilisin/Kexin innerhalb des Golgi-Netzwerks (Abb. 7 Punkte 1-4).

Bei der Familie der Proproteinkonvertasen (beispielsweise Furin, PC7) handelt es sich um Serinendoproteinasen des *trans* Golgi-Netzwerk (Nakagawa et al., 1993, Molloy et al., 1994). Die Substratspaltung erfolgt am Sequenzmotif (R/K) n-X-K/R'X, einer konservierten Sequenz der TGF- β Superfamilienmitglieder, die sich am C-Terminus der Prodomäne befindet (Abb. 6) (Basak et al., 1999, Remacle et al., 2008).

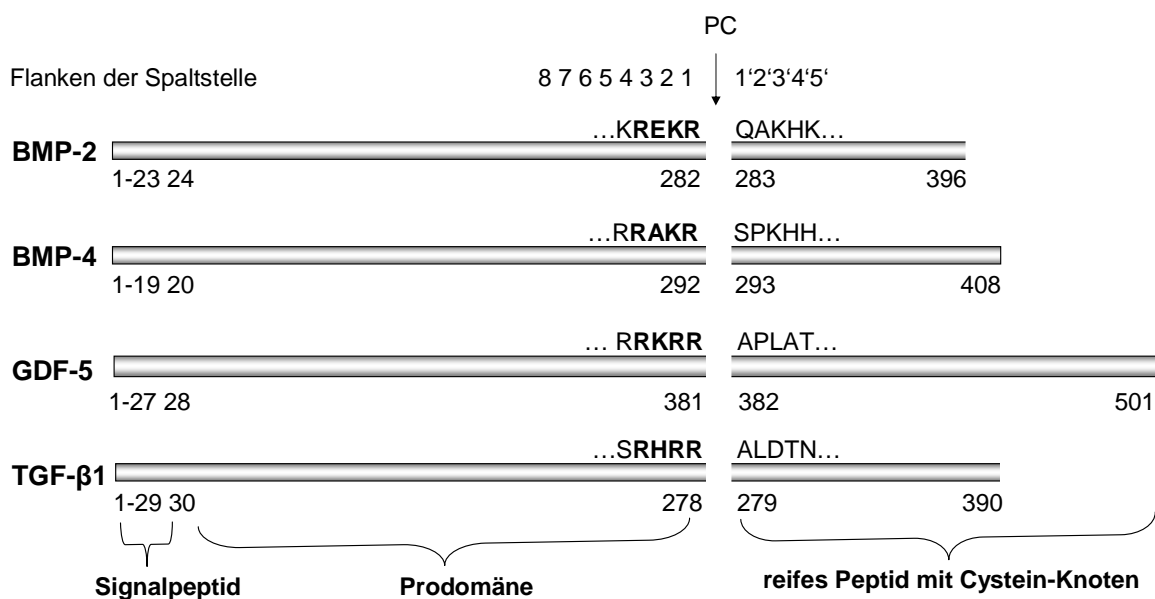


Abb. 6. Prozessierung der Proformen verschiedener TGF- β Superfamilien-Mitglieder. Angegeben sind die Lokalisationen des N-terminalen Signalpeptids, der großen Prodomäne sowie das reife Peptid in der C-terminalen Region. Die Aktivierung des reifen Proteins wird durch Abspaltung der Prodomäne initiiert. Für die Spaltung ist das homologe Sequenzmotif R-X-X-R bei Position 1-4 verantwortlich (fett markiert). Dieses Motif wird durch Proproteinkonvertasen (PC) erkannt und prozessiert. (Quelle aus uniprot.org)

Die physiologische Bedeutung der Proproteinkonvertasen lässt sich bei der Prozessierung diverser Wachstumsfaktoren erkennen, die einen Einfluss auf die Entstehung von Lungenkrebs, Brustkrebs, Arteriosklerose und Psoriasis ausüben (Seidah and Chretien., 1994).

Sekretierte Proproteine im Extrazellulärraum. Hinweise auf sekretierte Proproteine lieferte jedoch die rekombinante Expression von pro-BMPs in eukaryotischen Zellen (Israel et al., 1992).

Es wurde festgestellt, dass die Prodomäne, durch nicht vollständige posttranslationale Prozesse, in Verbindung mit dem reifen Peptid sekretiert wurde (Leighton and Kadler, 2003). Die stabilen extrazellulären Prodomänen-Komplexe wurden für pro-BMP-2,-4,-5,-7,-9,-10 und GDF-5, -11 nachgewiesen (Harrison et al., 2011, Lories et al., 2003). TGF- β wird ebenso mit Prodomäne sekretiert (Wakefield et al., 1988)

Regulation der biologischen Verfügbarkeit. BMPs sind durch ihre N-terminalen Ansammlung an basischen Aminosäuren besonders affin für die Bindung an Proteoglykane der Matrix (Ruppert et al., 1996, Ohkawara et al., 2002). Die Bindung inhibiert die freie Diffusion, und somit eine eventuelle Rezeptorbindung. Für pro-BMP-7 wurde eine direkte Interaktion mit der Matrixkomponente Fibrillin-1 festgestellt (Abb. 7) (Gregory et al., 2005).

Für TGF- β -1 und -2 wurde eine Interaktion mit Heparin und Heparansulfat nachgewiesen, jedoch zeigte TGF- β -3 keine Affinität (Lyon et al., 1997). Interessanterweise übten diese Proteoglykane eine verstärkende biologische Wirkung auf TGF- β -1 aus, jedoch keinerlei Effekte auf TGF- β -2 und -3 (Lyon et al., 1997). Für BMP-7 wurde ebenfalls eine Bindung an Heparansulfat aufgezeigt (Irie et al., 2003). Als weitere Liganden der Matrixkomponenten wurden Myostatin und Activin A identifiziert. Myostatin bindet mit seiner Prodomäne an Heparinsulfatproteoglykan Perlecan (Sengle et al., 2011; Robertson et al., 2010). Bei Activin A bindet die Prodomäne an die Heparansulfat Ketten von Perlecan und Agrin (Abb. 7) (Li et al., 2010).

Wie wichtig die Anheftung und Gradientenformation der Wachstumsfaktoren innerhalb der extrazellulären Matrix ist, zeigt eine Erkrankung namens Marfan-Syndrom (MFS). Dabei handelt es sich um eine Störung des Bindegewebes, die mit Befall des Skeletts, der Augen und dem Herzkreislaufsystem einhergeht (Robinson et al., 2006). Durch eine Genmutation von Fibrillin-1 (*Fbn1*) wird die Gradientenformation des TGF- β Komplexes gestört. TGF- β ist demnach ein wichtiger Ligand von Fibrillin-1, den elastischen Mikrofibrillen sowie Fibronektin (Harrison et al., 2011).

Wettbewerb und Aktivierung der Prodomäne mit Rezeptoren. Die große Prodomäne kann die Bindung an Rezeptoren stöchiometrisch inhibieren, wie die Kristallstrukturanalyse von pro-TGF- β -1 zeigen konnte. Hier blockiert die Prodomäne den Zugang zum TypI und TypII Rezeptor (Müller and Nickel 2012; Shi et al., 2011). Aus diesen Gründen wird der Prodomäne auch nach Sekretion eine wichtige Funktion in der Regulierung der BMP Aktivität zugeteilt. Ein Rezeptor-vermittelter Aktivierungsprozess von BMP-7, Activin A und AMH spricht für eine Regulation der Prodomänen-Abspaltung durch BMP Typ II-Rezeptoren (BMPRII, ActRIIA und AMHRII) (Abb. 7) (Sengle et al., 2008; di Clemente et al., 2010; Brown et al., 2005; Mekanji et al., 2011). Für latentes TGF- β wurde ein Aktivierungsmechanismus durch den *Mannose-6-Phosphat/Insulin like growth factor*-II Rezeptor nachgewiesen (Yang et al., 2000).

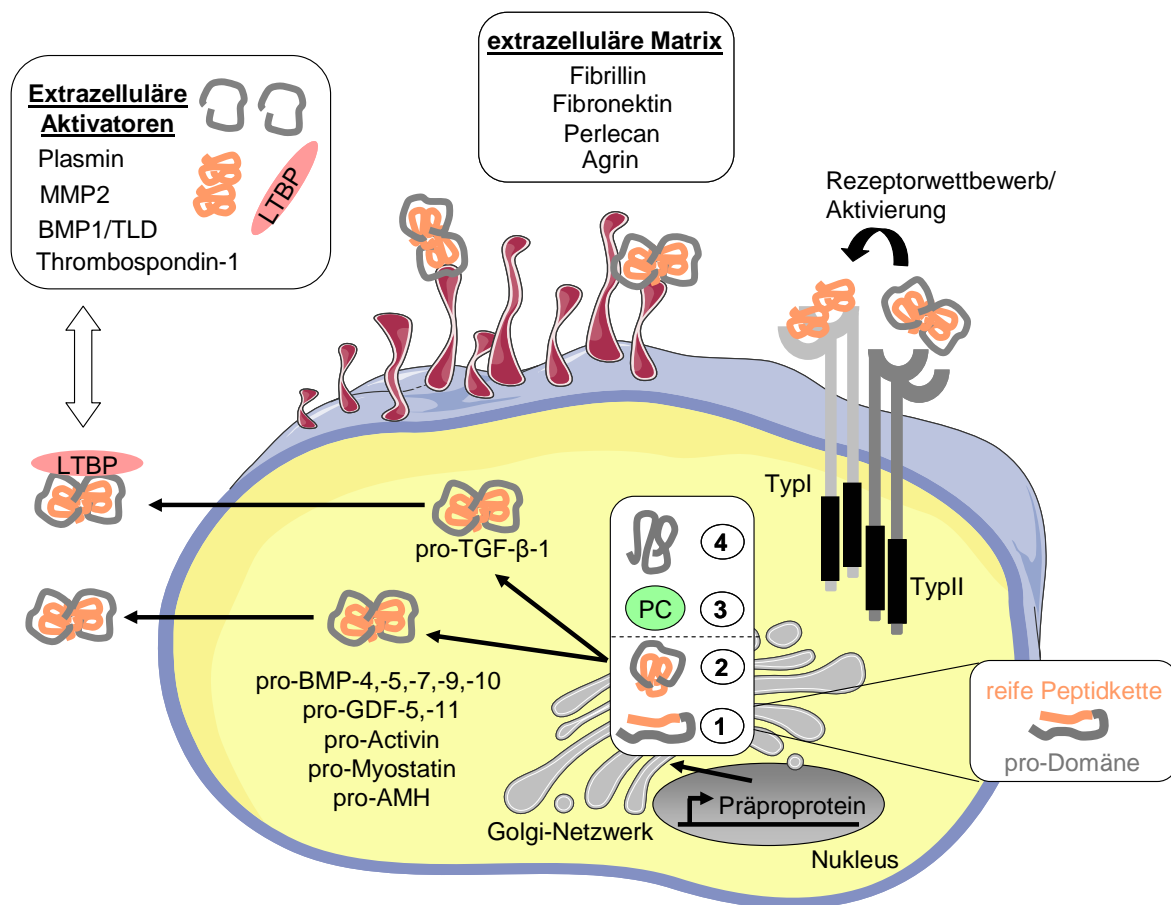


Abb. 7. Regulation der Prodomäne der TGF- β Superfamilienmitglieder. (1) Das Präproprotein wird im Golgi-Netzwerk gefaltet und modifiziert. Die Prodomäne hilft bei der Proteinfaltung (2) und Endoproteinkonvertasen (SPC) (3) spalten die Prodomäne ab (4). Es kommt jedoch nicht immer zur Abspaltung. Alternativ werden die gefalteten Proproteine (2) sekretiert. Eine extrazelluläre Spaltung der Prodomäne kann durch Plasmin, MMP2, Thrombospondin-1 und BMP1/TLD erfolgen. Die Prodomäne verstärkt auch die Affinität zu Proteoglykanen der extrazellulären Matrix und reguliert dadurch die freie Diffusion. Die Rezeptorbindung ist abhängig von der Prodomäne, kann jedoch auch durch Rezeptor TypII aktiviert werden. Details siehe Kapitel 1.4.2

Extrazelluläre Spaltung der Prodomäne. Im Falle von TGF- β -1, -2, -3 ist bekannt, dass die Aktivität des sezernierten Proteins durch seine Prodomäne reguliert wird. Im Extrazellulärraum vermag das *latency binding protein* (LTBP) an den latenten TGF- β Dimer zu binden (*latency-associated peptides* (LAP)), deren Prodomäne kovalent gebunden bleibt (Wakefield et al., 1988). Pro-TGF- β -1 kann durch Bindung von extrazellulären Thrombospondin-1 an die Prodomäne (Leu⁵⁴-Leu⁵⁷) aktiviert werden (Crawford et al., 1998). Die Aktivierung erfolgt auch durch Plasmin und MMP2, die den TGF- β Komplex proteolytisch spalten (Jenkins 2008).

Neben Thrombospondin-1, Plasmin und MMP2 wirkt die extrazelluläre BMP-1/Tolloid-ähnliche Metalloproteinase (BMP-1/TLD) proteolytisch auf die Proproteine (Abb. 7). BMP-1/TLD Proteinase wird zur Aktivierung von pro-GDF-8 und -11 benötigt (Lopez-Dee et al., 2011). Pro-GDF-8 wird dabei bei Position Arg⁹⁸-Asp⁹⁹ gespalten. Außerdem vermag BMP-1/TLD den

latentem BMP-10 Komplex zu aktivieren (Sengle et al., 2011). BMP-1/TLD spaltet auch LTBP von latentem TGF- β und überführt es somit in die aktive Form (Ge and Greespan 2006).

Demnach werden der großen Prodomäne mehrere intra- und extrazelluläre Funktionen zugeschrieben. Nach der Einführung in die Funktion und Regulation der BMPs erfolgt im letzten Abschnitt eine Skizzierung der Rolle von BMP-2 auf diverse Zelltypen.

1.4.3 Funktionen von BMP-2

BMP-2 ist in verschiedenen Organismen konserviert und Homologe wurden in *Drosophila*, *Xenopus laevis*, Zebrafisch und *Ascidia* identifiziert (Newfeld et al., 1997; Plessow et al., 1991; Martinez-Barbera et al., 1997; Miya et al., 1997). Vereint ist die Rolle von BMP-2 in der Entwicklung und Ausbildung verschiedenster Organe und Gewebe (Hogan 1996). Ein Gen *knockout* führt im Mausmodell daher zum Absterben des Embryos (Zhang and Bradley, 1996).

Effekt auf VSMCs. Im Gefäßsystem wird BMP-2 von VSMCs exprimiert (Willette et al., 1999). Zu seinen Funktionen gehören dabei Chemotaxis sowie Tumorgenese durch Neovaskularisierung (Langenfeld and Langenfeld 2004). Neben diesen pro-angiogenen Effekt wirkt BMP-2 auch proliferationsinhibierend auf VSMCs, was durch p21 induziert wird (Wong et al., 2003). In humanen pulmonalen VSMC wurde ein apoptotischer Effekt von BMP-2 ermittelt, jedoch ist der Mechanismus bisher ungeklärt (Zhang et al., 2003).

Interessant ist auch die Expression von BMP-2 durch VSMCs innerhalb des arteriosklerotischen Plaques (Abb. 1) (Dhore et al., 2001). Während der Neointima-Bildung im Rattenmodell wirkt BMP-2 protektiv. Adenoviral induzierte BMP-2 Überexpression führte zu einer reduzierten Neointima-Bildung der VSMCs des Plaques. Durch die reduzierte Neointima-Bildung verzögerte sich der Verschluss des Gefäßes, daher wird BMP-2 eine protektive Rolle in der Arteriosklerose-Entwicklung zugeschrieben (Nakaoka et al., 1997).

Effekt auf Endothelzellen. BMP-2 wurde auch in vaskulären Endothelzellen nachgewiesen (Csiszar et al., 2005). Durch die endotheliale Lokalisation wurde ein Zusammenhang von BMP-2 mit Entzündungsreaktionen aufgezeigt. Exogen appliziertes BMP-2 bzw. BMP-4 führte in Ratten zur endothelialen Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), was eine Inhibierung der Vasodilatation der Karotidarterienringe nach sich zog (Csiszar et al., 2006). Durch die Freisetzung von ROS wird die Affinität des Endothels zu zirkulierenden Endzündungszellen erhöht (Csiszar et al., 2008; Sorescu et al., 2004). Demnach reguliert BMP-2 auch eine frühzeitige Antwort auf Entzündungsparameter im Gefäß (Derwall et al., 2012).

Osteoblasten und Knochenbildung. Die Knochenbildung ist ein ständiger Remodellierungsvorgang, der während der gesamten Lebenszeit andauert. Zwei Zelltypen sind für die Balance von Knochenbildung und Knochenresorption verantwortlich:

Osteoblasten und Osteoklasten, die mesenchymalen Ursprungs sind (Saltanoff et al., 2009; Huang et al., 2007). Um die Knochenbildung anzutreiben, müssen osteoblastspezifische Markergene (beispielsweise Runx2, Msx2, Osteocalcin, ALP, Osterix, TypI Kollagen) durch TGF- β /BMP/Wnt/Notch/FGF/Hedgehog- und Parathyroidhormon-Signalweg induziert werden (Chen et al., 2012). Kontrolliert wird die Knochenbildung vor allem durch RANKL und Sclerostin (Xiong and O'Brien 2012). BMP-2 ist ein Hauptspieler der Osteoblastdifferenzierung, indem es Runx2 induziert, und eine Matrixakkumulation der Zellen auslöst (Xiong and O'Brien 2012). Desweiteren induziert BMP-2 Sox9 und Col2a, wodurch eine Kondensation der mesenchymalen Zellen ausgelöst wird (Rosen 2009). BMP-2 ist wichtig für die Chondrozyten Proliferation und Reifung während der endochondralen Knochenbildung (Shu et al., 2011). Die endochondrale Knochenbildung (Ossifikation), bei der Knorpel durch Knochengewebe ersetzt wird, wird gefolgt von der zweiten Phase der Knochenbildung, der intramembranösen Ossifikation. Dabei werden die Knochen durch Kondensation der Mesenchymalzellen geformt (Saltanoff et al., 2009; Huang et al., 2007). Die ektopische Knochenbildung wurde ausgiebig an der unausdifferenzierten Mausmyoblasten Zelllinie C2C12 untersucht, die durch BMP-2 Stimulierung zu Osteoblasten ausdifferenzieren können (Katagiri et al., 1994). Ein konditionaler *knock-out* von BMP-2 führt zu ernsten Chondrodysplasia Phänotyp (Shu et al., 2011), spontanen Knochenfrakturen (Tsuji et al., 2006) sowie gestörter Osteogenese im Mausmodell (Bandyopadhyay et al., 2006).

Effekt auf Hepatozyten. Neben der Embryonalentwicklung der Leber (Rossi et al., 2001) wirkt BMP-2 auch regenerativ auf das adulte Organ. Dabei reguliert es die Hepatozytenproliferation nach Leberschädigung (Xu et al., 2006). Eine weitere Rolle spielt BMP-2 im Eisenmetabolismus der Hepatozyten. Dort bildet der Korezeptor Hemojuvelin Komplexe mit den BMP TypI und TypII Rezeptoren. Aktivierter Smad1/5/8/4 Komplex veranlässt die Transkription von Hpcidin (Casanovas et al., 2009). Hpcidin reguliert den Eisenhaushalt der Leber, indem es den Eisenefflux aus Hepatozyten durch Inhibierung des Eisentransporters Ferroportin verhindert, und seine lysosomale Degradation einleitet (Gkouvastos et al., 2011).

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass BMP-2 auch nach der Embryonalentwicklung diverse Effekte auf Organe sowie das vaskuläre Endothelium aufweist.

Die Regulation der BMPs ist von hohem medizinischem Interesse, beispielsweise wird rekombinantes BMP-2 bei Knochenfrakturen verwendet (InFuse Bone Graft, Medtronic Sofamor Danec USA, Inc.). Aktuelle Forschungsarbeiten beschäftigen sich mit BMP-Signalwegen, um Therapien bei vaskulärer Kalzifizierung und Arteriosklerose zu etablieren.

2 Aufgabenstellung

Seit dem bekannt ist, dass die zirkulierende Faktor VII-aktiverende Protease ein kardiovaskulärer Risikofaktor ist, drängt sich die Frage auf, die zu Grunde liegenden Mechanismen zu verstehen. Es stellte sich heraus, dass ihre proteolytische Aktivität durch einen Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) „Marburg I“, mit 5 %-iger Häufigkeit der westlichen Bevölkerung, stark reduziert ist. Laut der patientenorientierten Bruneck-Studie von 2003 ist dieser SNP mit der Entstehung von koronarer Stenose und Arteriosklerose assoziiert. Daher liegt die Vermutung nahe, dass funktionelle FSAP durch Proteolyse unbekannter Faktoren protektiv wirken könnte. Die Identifizierung von FSAP Substraten, die mit vaskulären Remodellierungsvorgängen wie der Atherogenese assoziiert sind, ist daher von klinischer Relevanz.

Unserer Arbeitsgruppe ist es bereits gelungen, das Cystein-Knoten Protein PDGF-BB als FSAP Substrat zu identifizieren. Die Proteolyse von PDGF-BB führte im Mausmodell zu einer Reduktion der Proliferation und Migration von VSMCs, was sich protektiv auf die Neointimabildung nach Endothelverletzung auswirkte.

Aus diesem Befund wurde die Vermutung aufgestellt, dass FSAP auch mit weiteren strukturell verwandten Wachstumsfaktoren der Cystein-Knoten Protein Familie interagieren könnte. Diese Hypothese wurde durch die Beobachtung bekräftigt, dass FSAP Antigenspiegel sowie Proteinaktivität mit vaskulärer Entzündung korrelieren, und FSAP in instabilen Plaques der Arteriosklerose detektiert wurde.

Proliferations- und Differenzierungsvorgänge während der Atherogenese werden unter anderen von den Wachstumsfaktoren der TGF- β Superfamilie moduliert. Deren biologische Aktivität wird posttranskriptionell durch Bindung an lösliche Proteine reguliert, und ist mit vaskulärer Fibrose, vaskulärer Kalzifizierung oder Endothelaktivierung verknüpft.

Diese Wachstumsfaktoren werden als große inaktive Präproproteine synthetisiert, deren Aktivität von der Abspaltung der Prodomäne abhängig ist. Häufig sind intrazelluläre Proteasen der Furinfamilie für diese Prozessierung zuständig, jedoch kann die sekretierte Proform auch von bisher weitgehend unbekannten Proteasen gespalten werden.

Das Ziel dieser vorliegenden Arbeit ist es, eine mögliche Wechselwirkung der FSAP mit TGF- β Superfamilienmitglieder auf biochemischer und zellbiologischer Ebene zu analysieren. Dies soll durch Untersuchungen zur Proproteinregulation durch Mutationsstudien verfestigt werden. Diese Studie könnte eine Bereicherung für die bisherigen Erkenntnisse der FSAP als therapeutisches Medikament bringen.

3 Materialien

Eingesetzte humane Proteine und Peptide

Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Aktosolv® (uPA)	CSL Behring, Marburg, Deutschland
BMP-2	freundliche Gabe von Prof. E. Schwarz (Halle) Hillger, F. et al., 2005 <i>J Biol Chem</i> .
Furininhibitor	Merck, Darmstadt, Deutschland
FIIa	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
FXa	Novagen Merck, Darmstadt, Deutschland
FSAP	aufgereinigt aus humanem Plasma
Plasminogen	aufgereinigt aus humanem Plasma
pro-BMP-2	freundliche Gabe von Prof. E. Schwarz (Halle) Hillger, F. et al., 2005 <i>J Biol Chem</i> .
pro-TGF- β -1	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
TGF- β -1	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
Xigris® (APC)	Lilly, Indianapolis, USA

Verwendete Antikörper

Primärantikörper	Spezies	Isotyp	Hersteller
Anti-BMP-2	Kaninchen	polyklonal	Dianova GmbH, Deutschland
Anti-BMP-2	Ziege	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-Kontroll IgG	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-GDF-5	Kaninchen	polyklonal	Freundliche Gabe von Frank Plöger, Biopharm GmbH, Heidelberg
Anti-phospho Smad1/5/8	Kaninchen	polyklonal	Cell Signalling Technology Inc. USA
Anti-Smad 1	Kaninchen	polyklonal	Cell Signalling Technology Inc. USA
Anti-FSAP ME New	Kaninchen	polyklonal	freundliche Gabe von Dr. Michael Etscheid (Langen)
Sekundärantikörper	Spezies	Isotyp	Hersteller
Alexa Fluor® 488nm	donkey	polyklonal	Molecular Probes, Eugene, USA
Alexa Fluor® 546nm	donkey	polyklonal	Molecular Probes, Eugene, USA
Anti rabbit POD	Schwein	polyklonal	Dako, Hamburg

Verwendete Nukleinsäuren

Oligonukleotide	Sequenz (5'-3')	T_M (C°)
SEC_proBMP_hu_For	GGGAGCTTGGGCGCGGCTGGCCTCGTT	70
Rev_BMP_BamHI	GCCGGATCCTTACTAGCGACACCCACAACC	70
hpB_K258S For	AAAAGGGCATCCTCTCCACTCTAGAGAAAAAC GTCAAGC	69
hpB_K258S Rev	TTGACGTTTTTCTCTAGAGTGGAGAGGATGCCC TTTTCC	69
hpB_R262S For	TCTCCACAAAAGAGAAAGTCGACAAGCCAAAC ACAAACAGCG	69
hpB_R262S Rev	CTGTTTGTGTTTGGCTTGTCGACTTTCTCTTTTG TGGAGAGG	69
hpB_K265S For	ACAAAAGAGAAAAACGTCAAGCTTCACACAA ACAGCGGAAACGCC	69
hpB_K265S Rev	CGTTTCCGCTGTTTGTGTGAAGCTTGACGTTTT TCTCTTTTGTGG	69
hpB_newR269S For	CAAACACAAACAGTCGAAACGCCTTAAGTCCA AGCTGTAAGAG	65
hpB_newR269S Rev	CTTACAGCTGGACTTAAGGCGTTTCGAACTGTT TGTGTTTGGC	65
hpB_K270S For	CAAACACAAACAGCGGAGTCGACTTAAGTCCA GCTGTAAGAG	69
hpB_K270S rev	CTTACAGCTGGACTTAAGTCGACTCCGCTGTTT GTGTTTGGC	69
hupB_E260S_R262S FOR	GGAATCCTCTCCACAAAAGATCAAAAAGTCAA GCCAAACACAAAC	62
hupB_E260S_R262S REV	TTGTGTTTGGCTTGACTTTTTGATCTTTTGTGGA GAGGATGCCC	62
hupB_ERK260_262S SS FOR	ATCCTCTCCACAAAAGATCATCAAGTCAAGCC AAACACAAACAGCG	62
hupB_ERK260_262S SS REV	CTGTTTGTGTTTGGCTTGACTTGATGATCTTTTG TGGAGAGGATGC	62
hupB_newR269S FOR	CAAACACAAACAGTCGAAAGCCCTTAAGTCCA GCTGTAAGAG	62

hupB_newR269S REV	CTTACAGCTGGACTTAAGGCGTTTGTGTTTGGC	62
hupB_Q268S_R269S FOR	TCAAGCCAAACACAAATCGTCGAAACGCCTTA AGTCCAGC	62
hupB_Q268S_R269S REV	TGGACTTAAGGCGTTTCGACGATTTGTGTTTGG CTTGACG	62
hupB_KQR267_S269 SSS FOR	AAAAACGTCAAGCCAAACACTCATCGTCGAAA CGCCTTAAGTCC	62
hupB_KQR267_S269 SSS REV	ACTTAAGGCGTTTCGACGATGAGTGTTTGGCTT GACGTTTTTC	62

qPCR Oligonukleotide	Sequenz (5'-3')	T_M (C°)
mo_Hamp_For	TGAGCAGCACCACTATCTC	60
mo_Hamp_Rev	TGGCTCTAGGCTATTTTGC	60
mo_FSAP04_for	TTCCGACACAGACGGAGA	60
mo_FSAP04_rev	GTCGTCCGGACCTATTTTACA	60
mo_GAPDH_For-2	GGCATTGTGGAAGGGCTCA	60
mo_GAPDH_Rev-2	ATCACGCCACAGCTTTCCA	60
hu_GAPDH_For	CCACATCGCTCAGACACCAT	60
hu_GAPDH_Rev	CGCAACAATATCCACTTTACCAGAG	60
hu_Id1_For	ATCAGGGACCTTCAGTTGGAGC	60
hu_Id1_Rev	AGACCCACAGAGCACGTAATTCC	60
mo_Plg_For	ACTACAGATCCGAAAAGAGA	60
mo_Plg_rev	CAGGGATGTATCCATGAGCA	60
hu_Smad6_For	TCTCCTCGCGACGATACAAG	60
hu_Smad6_Rev	GAGCAGTGATGAGGGAGTTGG	60
mo_TGFβ_For	TGAGTGGCTGTCTTTTGACG	60
mo_TGFβ_Rev	GGTTCATGTCATGGATGGTG	60

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Kultivierung

Unausdifferenzierte C2C12 Maus Myoblasten (DSMZ, Leibniz, Deutschland) wurden in RPMI1640 Medium (Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland) mit 10 % v/v FCS (Thermo Scientific), 1 U/ml Penicillin, 1 µg/ml Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) kultiviert. C2C12 Primäre humane glatte Muskelzellen (*Coronary Artery Smooth Muscle Cells*; CASC) wurden von der Firma Lonza-Clonetics (Köln, Deutschland) verwendet und in ECMB-Medium (Promocell) mit 10 % v/v FCS, 1 ng/ml bFGF sowie 0,1 ng/ml EGF (Promocell), 1 U/ml Penicillin, 1 µg/ml Streptomycin kultiviert. Die Kultivierung von der murinen Hepatozytenzelllinie AML12 (freundliche Gabe von Prof. Dieter Glebe, Gießen) erfolgte in DMEM Medium (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit 10 % v/v FCS, 1 % Na-Pyruvat (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 1% v/v Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 1 U/ml Penicillin sowie 1 µg/ml Streptomycin. Für HEK293 (*human embryonic kidney cells*) (ATCC) wurde ebenfalls dieses Medium verwendet. Die murinen Bindegewebezellen MCHT1/26 (freundliche Bereitstellung von Dr. Frank Plöger; Heidelberg) wurden in α -DMEM (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) mit 10 % v/v FCS, 2 mM Glutamin, 1 U/ml Penicillin und 1 µg/ml Streptomycin kultiviert. Die Kultivierung von MLEC (*mink lung epithelial cells*) (freundliche Gabe von Ph.D. Daniel B. Rifkin, New York) erfolgte in DMEM Medium mit 10 % v/v FCS, 6,32 g/L HEPES (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) sowie 1 U/ml Penicillin sowie 1 µg/ml Streptomycin.

4.1.2 Bestimmung der Induktion von Alkalischer Phosphatase

Um die biologische Aktivität von aktiven BMP-2 zu bestimmen, wurde der Transdifferenzierungsprozess von unausdifferenzierten Myoblasten (C2C12) in Chondrozyten durch Induktion der alkalischen Phosphatase (ALP) ermittelt (Katagiri et al., 1998).

C2C12 Myoblasten wurden auf eine Mikrotiterplatte (Nunc) ausgesät (1×10^3 Zellen/ well) und nach 24 h stimuliert. Pro-BMP-2 bzw. BMP-2 (10-100 nM) sowie FSAP (0,1–50 nM) in Anwesenheit/Abwesenheit von Heparin (25 µg/ml) bzw. Aprotinin (10 µg/ml) wurden vorinkubiert (30 min bei 37°C) und zu den Zellen hinzugefügt (mit 2 % v/v FCS) Nach 72 Stunden wurden die Zellen mit PBS (0,137 M NaCl, 0,0027 M KCl, 0,0081 M NaH₂PO₄, 0,0018 M KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen. Zur Herstellung der Zellextrakte wurden die Zellen mit ALP-

Puffer (100 µl) (100 mM Glyzin, 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂, 1% p-Nonidet, pH 9,6) für 2 Stunden bei RT inkubiert, abzentrifugiert (10 min, 4000 rpm, RT) und 20 µl der Überstände in eine neue Mikrotiterplatte überführt. Dem ALP-Puffer wurden 9 mM Phosphatase-Substrat (p-Nitrophenyl-Phosphat, Sigma) zugefügt und 180 µl/well zu den Überständen gegeben. Der Substratumsatz der alkalischen Phosphatase konnte durch Messung der Absorption bei 405 nm (30 min) im ELISA-Reader ermittelt werden.

4.1.3 Zellstimulierung zur Smad 1/5/8 Phosphorylierung

Zur Untersuchung des BMP-2 induzierten intrazellulären Signalweges wurde die Phosphorylierung von Smad 1/5/8 durch die aktivierte BMP-Rezeptor Kinase ausgewählt.

Die Zellen wurden auf 6-well Platten (Greiner) ausgesäht und nach Erreichen der Konfluenz für 2 h serumfrei gehalten. Für die Stimulierung wurde pro-BMP-2 bzw. BMP-2 (200 ng/ml) mit FSAP (0,01– 1 µg/ml) vorinkubiert (30 min, 37°C). Die Reaktion wurde mit 10 µg/ml Aprotinin abgestoppt (5 min, 37°C) und anschließend die Zellen für 30 min stimuliert. Danach wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen (0,137 M NaCl, 0,0027 M KCl, 0,0081 M NaH₂PO₄, 0,001 M KH₂PO₄, pH 7,4) und Zellextrakte mit RIPA-Puffer hergestellt (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 1 % SDS, pH 7,4 sowie 1 mM Natrium Orthovanadat und PMSF). Nach 30 min auf Eis wurden die Proben zentrifugiert (10 min, 400 rpm, 4°C). Der Überstand wurde anschließend mit 4 x SDS-Probenpuffer (25 % Sammelgelpuffer, 5 % SDS, 40 % Glycerin, 1 Spatelspitze Bromphenolblau) versehen und bei 100°C für 10 min denaturiert. Mittels Western blot Methode wurde die Phosphorylierung durch anti-Smad1/5/8 (Cell Signalling, USA) 1:1000 sowie anti-rabbit-POD Antikörper (Dako) 1:5000 analysiert. Die densitometrische Analyse erfolgte mit dem Softwareprogramm „Intas Analyse Software“ (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen).

4.1.4 Bestimmung der DNA-Synthese (BrdU-Proliferations ELISA)

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurde die DNA-Neusynthese nach Stimulierung ermittelt. Dazu wurde das 5-Bromo-2-Deoxyuridine (BrdU) als Analogon zur Nukleotid Base Thymidin in die wachsende DNA-Kette eingebaut und mittels ELISA bestimmt („Cell Proliferation ELISA BrdU (calorimetric), Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland).

C2C12 Myoblasten wurden auf einer Mikrotiterplatte (Nunc) ausgesäht und nach Erreichen der 70 %-igen Konfluenz für 2 Stunden in Medium mit 0,2 % FCS überführt. Für die Stimulierung wurde pro-BMP-2 bzw. BMP-2 (300 ng/ml) mit FSAP (1 µg/ml) in Anwesenheit/Abwesenheit von 25 µg/ml Heparin oder 10 µg/ml Aprotinin vorinkubiert (30 min bei 37°C) und anschließend mit 10 µg/ml Aprotinin abgestoppt (5 min 37°C). Die Stimuli wurden als Triplikets angewendet

und nach 12 Stunden wurde BrdU nach Herstellerangaben hinzugefügt und der ELISA durchgeführt.

Die Messung erfolgte bei 450 nm im ELISA Reader (EL808i Ultra Microplate Reader“, BioTec, Bad Friedrichshall, Deutschland). Die optische Dichte wurde korrigiert gegen den „Nullwert“, indem kein BrdU zu den Zellen zugefügt wurde. Als Kontrollen dienten unstimulierte, und mit 10 % v/v FCS behandelte Zellen.

4.1.5 Plasmid-Transfektion von HEK-293 Zellen

Für die Einbringung von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen wurde das Lipofectamin2000® Reagenz verwendet (Invitrogen). Die Zellen wurden 1 Tag zuvor im Antibiotika freien Vollmedium ausgesäht (6-well Platte, Greiner) und für die Transfektion in FCS freies Medium überführt. Der Transformationsansatz wurde nach Herstellerangaben angesetzt. Der Transformationsansatz wurde über Nacht im serumfreien Medium mit den Zellen inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen gewaschen und die Proteinexpression in serumfreien Medium mit 1 % (vv) Antibiotika und 1 % Insulin-Transferin-Selenin (Sigma) für 24 h gestartet. Die Expression erfolgte in Anwesenheit/Abwesenheit von 0,05 mM Furininhibitor (Merck, Darmstadt, Deutschland). Die Kulturüberstände wurden geerntet, filtriert (0,22 µM) und eingefroren.

4.1.6 *HABP2*-Herunterregulation durch siRNA-Transfektion

Um die Genexpression von FSAP herunterzuregulieren, wurde sich des Verfahrens des *knockdown* durch siRNA bedient.

Für den Herrunterregulation von FSAP wurde siRNA für das murine *HABP2*-Gen verwendet (FlexiTube siRNA SI00238105 QIAGEN, Deutschland). Um Nebeneffekte auszuschließen, wurde außerdem murine Negativkontroll-siRNA (FlexiTube siRNA 1022075 QIAGEN) verwendet. Die Transfektion in Hepatozyten wurde nach Hersteller Angaben durchgeführt. Dafür wurde pro Ansatz 75 ng siRNA (0,6 µl) mit 3 µl Hiperfect®-Transfektionsreagenz (QIAGEN) gemischt (100 µl Volumen) und im Reaktionsgefäß vorinkubiert (20 min, RT). Die Transfektion erfolgte in konfluenten Hepatozyten, die 1 Tage zuvor auf 12-well Platten (Nunc) ausgesäht wurden. Die Transfektion erfolgte im Hungermedium (300 µl/well). Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C wurde das Medium gegen serumfreies Medium ausgetauscht. Die Zellen konnten nun nach Belieben stimuliert werden.

4.2 Proteinspezifische Methoden

4.2.1 Bindungsstudie von FSAP an pro-BMP-2 und BMP-2

10 µg/ml pro-BMP-2 bzw. BMP-2 (100 mM Na-Carbonat pH 9,5) wurde auf einer Mikrotiterplatte (Maxisorb, Nunc) über Nacht bei 4°C immobilisiert. Ungebundener Wachstumsfaktor wurde durch Waschen mit TBS-T (0,025 mM Tris, 0,15 M NaCl, 0,002 M KCl, 0,0018 M KH₂PO₄, 0,1% Tween-20, pH 7,4) entfernt, und anschließend mit 3% BSA (w/v) in TBS-T für 1 Stunde bei RT blockiert. Anschließend wurde FSAP konzentrationsabhängig (0,2-2 µg/ml) in Anwesenheit/ Abwesenheit von Heparin (25 µg/ml) bzw. Aprotinin (10 µg/ml) hinzugefügt. Ungebundenes FSAP wurde mit TBS-T abgewaschen, und für die FSAP-Detektion mAb677 Antikörper (CSL Behring, Marburg, Deutschland) verwendet (1 h bei RT). Nach erneuten Waschen wurde der POD-konjugierte Sekundärantikörper (DAKO) beigelegt (45 min, RT) und nach dem letzten Waschschrift die Absorption bei 405 nm im ELISA-Reader (EL808i Ultra Microplate Reader“, BioTec, Bad Friedrichshall, Deutschland) ermittelt.

4.2.2 FSAP Enzymaktivitätstest

Die Enzymaktivität wurde mittels Hydrolyse des chromogenen Substrates S-2288 (H-D-Isoleucyl-L-Prolyl-L-Arginin-p-Nitroanilindihydrochlorid) (Haemochrom, Deutschland) ermittelt. Eine Mikrotiterplatte (Nunc) wurde mit 3 % BSA (w/v) in TBS-T blockiert (30 min RT) und FSAP in TBS-T mit 2 mM CaCl₂ hinzugefügt. Die Messung mit 0,2 mM chromogenen Substrat erfolgte für 30 min bei 37°C im ELISA-Reader (EL808i Ultra Microplate Reader“, BioTec, Bad Friedrichshall, Deutschland) bei 405 nm.

Protein Gelelektrophorese

4.2.3 Herstellung von SDS-Proben zur Gelelektrophorese

Zellüberstände wurden abgenommen, zentrifugiert (10 min, 2000 rpm, RT), filtriert (0,22 µm, Milipore) und die Überstände mit 4 x SDS-Probenpuffer versetzt (25 % Sammelgelpuffer, 5 % SDS, 40 % Glycerin, 1 Spatelspitze Bromphenolblau +/- 2,5 % β-Mercaptoethanol (v/v)) und denaturiert.

Für die Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen mit PBS-Puffer (0,137 M NaCl, 0,0027 M KCl, 0,0081 M NaH₂PO₄, 0,0018 M KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen und anschließend durch Zugabe von 1 x SDS-Probenpuffer lysiert. Die Proben inkubierten für 30 min bei RT. Danach wurden die Lysate mit 2,5 % β-Mercaptoethanol (v/v) versetzt, und anschließend denaturiert.

4.2.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse der Proteingröße wurde sich der Gelelektrophorese bedient. Hier wandern Proteine im elektrischen Feld und werden anhand ihrer Größe durch das Polyacrylamidnetz aufgetrennt. Je nach Proteingröße wurden 15 % bzw. 12 % -ige Acrylamid Tris-Glycin Trenngele verwendet. Das Trenngel (SDS-Trenngelpuffer 2,5 M Tris-HCl, 4 % SDS, pH 8,8 15 % Acrylamid, 0,1 % (v/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED) wurde nach Auspolymersieren mit dem Sammelgel (SDS-Sammelgelpuffer 1 M Tris-HCl, 4 % SDS, pH 6,8, 5 % Acrylamid, 0,1 % (v/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED) überschichtet. Für den Lauf wurde eine Elektrophoresekammer (Mini Transblot, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) mit SDS-Laufpuffer verwendet (SDS-Laufpuffer 0,0025 M Tris, Glyzin, 0,25 M, 1 % SDS). Als Standard diente ein Proteinmarker (120 kDa–10 kDa; PageRuler, Fermentas). Der Lauf dauerte ca. 1,5 Stunden mit einer angelegten Spannung von 25 mA/Gel (Powerpac 1000, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland).

4.2.5 Coomassie Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Coomassie Färbung dient der Visualisierung des Gesamtprotein-Bandenmusters (3-5 µg Protein) nach abgeschlossener SDS-Gelelektrophorese. Das Gel wurde mit Coomassie-Färber (0,2 % Coomassie R250, 20 % Essigsäure, 80 % Methanol) für ca. 60 min bei RT inkubiert. Zum Entfärben wurde die Entfärberlösung (20 % Methanol, 10 % Essigsäure) etwa alle 10-30 min gewechselt.

4.2.6 Western blot-Analyse

Bei der Western blot-Analyse wird ein spezifisches Protein durch Immunfluoreszenz eines gekoppelten Antikörpers detektiert. Dazu ist es nötig, die bei der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Membran für die spätere Detektion zu transferieren.

Nach SDS-PAGE wurde das Polyacrylamid-Gel in einem „Sandwich“ für die Proteintransferierung in einer Kasette zusammengebaut: Schwamm/3 mm Whatman Papier/PVDF Membran/Polyacrylamid Gel/ 3 mm Whatman Papier/Schwamm.

Der Transfer wurde in einer Blot-Aparatur mit kaltem Blot-Puffer (0,02 M Tris, 0,15 M Glyzin, 20 % Methanol) und einer angelegten Spannung von 100 V für 1,5 Std durchgeführt (Powerpac 1000, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland).

Um unspezifische Bindung des Primärantikörpers an die PVDF-Membran zu verhindern, wurde die Membran mit 5 % BSA in TBS-T Puffer (0,025 M Tris, 0,15 M NaCl, 0,002 M KCl, 0,0018 M KH₂PO₄, 0,1 % Tween-20, pH 7,4) blockiert (1 h bei RT). Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C. Der Antikörper wurde im Blockierungs-Puffer je nach Herstellerangaben verdünnt. Am darauf folgenden Tag wurde die Membran 3 x mit TBS-T Puffer

für 10 min gewaschen und für 45min mit dem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Nach 3 x Waschen mit TBS-T Puffer erfolgt der eigentliche Reaktions Nachweis mittels Chemilumineszens (ECL, GE Healthcare).

4.2.7 N-terminale Sequenzierung (Edman Abbau)

Für die Immobilisierung der Peptide wurde SDS-PAGE unter reduzierender Bedingung angewandt. Es wurden 5 µg Protein eingesetzt und das Gel anschließend geblottet und die Membran für 5 min Coomassie gefärbt (0,2 % Coomassie R250, 20 % Essigsäure, 80 % Methanol). Die Membran wurde entfärbt (20 % Methanol, 10 % Essigsäure) und anschließend über Nacht in ddH₂O gewaschen. Die zu identifizierenden Peptid-Banden wurden mit einem sauberen Skalpell extrahiert und die Massenspektrometrie bei Prof. Dr. Günther Lochnit (Gießen) in Auftrag gegeben.

4.3 DNA spezifische Methoden

4.3.1 Plasmid-DNA Isolation aus *E.coli*

Zur Plasmid-Isolation aus transformierten *E.coli* Bakterien wurden diese mit 2 x YT-Medium (16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl, pH 7,2 und 100 µg/ml Ampicillin) angezogen (37°C, 180 rpm). Die Bakterien wurden geerntet (10 min, 4000 rpm, 4°C) und das Bakterien-Pellet mit dem „PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep kit“ (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgearbeitet.

4.3.2 Sterilfällung von Plasmid-DNA

Zur Fällung wurde der Plasmid-DNA 1/10 Volumen Na-Acetat (pH 3,0) zugefügt und anschließend 2,3–3 Volumen eiskalter 95 % Ethanol. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurde die gefällte DNA abzentrifugiert (30 min, 12000 rpm, 4°C) und der Überstand unter sterilen Bedingungen abgenommen. Das DNA-Pellet wurde mit 70 %-igen Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in sterilen H₂O gelöst.

4.3.3 RNA-Isolation aus Zellextrakten

Es wurde das „GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit“ (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland) nach Hersteller Angaben verwendet. Vor der Ernte wurden die Zellen mit PBS Puffer gewaschen und die RNA nach Herstellerangaben isoliert.

4.3.4 Bestimmung der Nukleinsäure Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe eines Spektralphotometers (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Hierzu wurde das Gerät mit einer Leerprobe geeicht, und anschließend die verdünnte Nukleinsäurenkonzentration (5 μ l + 80 μ l H₂O) gemessen. Das Gerät ermittelte die DNA-Absorption bei 260 nm Wellenlänge. RNA wurde bei einer Absorption von 260/ 280 nm gemessen. Der Ratio in RNA-Verdünnungen mit 10 mM Tris-HCl pH 7,5 liegt zwischen 1,9-2,1 ($A_{260}=1$ entspricht 40 μ g/ml RNA) (Bench Guide, QIAGEN).

4.3.5 Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA

Um die Genexpression quantitativ mit PCR auswerten zu können, musste die isolierte RNA zunächst in cDNA transkribiert werden. Dazu wurde das „High Capacity cDNA Transkription-Kit“ (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die cDNA-Synthese erfolgte nach Herstellerangaben.

4.3.6 quantitative Realtime PCR (qPCR)

Zur Analyse der Genexpression wurde quantitative Realtime PCR mittels SYBR Green® verwendet, wobei dieser Farbstoff in doppelsträngige DNA interkaliert und dabei eine Emission erzeugt. Die emittierte Fluoreszenz des DNA/Farbstoffkomplex nimmt proportional zur Amplifikation des PCR-Produktes zu, und kann mit entsprechender Optik eines Realtime Zyklers gemessen werden. Die Absorption findet dabei bei $\lambda_{\text{max}} = 498 \text{ nm}$ und die Emission bei $\lambda_{\text{max}} = 522 \text{ nm}$ statt.

Um die veränderte Genexpression der mRNA zu untersuchen, wurden Exon übergreifenden Oligonukleotid-Paaren (Thermo Fisher Scientific; Oberhausen, Deutschland) verwendet, die nur cDNA amplifizieren, und keine genomische DNA.

Für die qPCR wurde zunächst ein Mastermix nach Herstellerangaben hergestellt (1 x Ansatz: 10 μ l 2x SYBR I Mix, 9,4 μ l H₂O inj. 0,175 μ l je Oligonukleotid (10 pmol/ μ l)). Die cDNA-Matrize (10 ng/ μ l) wurde als Duplikets in eine Mikrotiterplatte (Thermo-Fast 96 PCR Detection Plate, ABGene- Thermo Fisher Scientific, Epsom, UK) vorgelegt, mit Mastermix versetzt und die Platte mit Folie versiegelt (Absolute Q-PCR Seal, ABGene- Thermo Fisher Scientific) und anschließend abzentrifugiert (4000 x g, 30 Sek). Die Messung der qPCR erfolgte im Step One Plus Cyclet (95°C - 10 min, 95°C – 15 Sek, 60°C – 30 Sek, 72°C – 30 Sek (40 Zyklen) Schmelzkurve: 60 - 95°C 1 min) (Step One Plus, Applied Biosystems, Mannheim, Deutschland). Die Fluoreszenzmessung erfolgte nach jedem beendeten Elongationsschritt (40 Zyklen). Alle Messpunkte wurden als .eds und .excel Datei abgespeichert und ausgewertet.

4.3.7 Analyse der Realtime PCR (qPCR)

Für jede Proben-Gruppe wurde der sogenannte c_T -Wert (*threshold*) ermittelt, dabei handelt es sich um den Zyklus, ab dem die Fluoreszenz linear ansteigt (Review siehe Wong and Medrano 2005)

Ein kleiner c_T -Wert ergibt sich aus einer schnellen Polymerase-Reaktion, die viel Matrizen DNA vorfindet, ein großer c_T -Wert steht für eine langsame Reaktion, in der der lineare Anstieg wegen geringer Matrize spät beginnt.

Da zu Beginn der qPCR-Reaktion Hintergrund Aktivität (=Fluoreszenz) messbar ist, wird ein *threshold* gewählt, der überhalb dieses Rauschens liegt. Der *threshold* definiert demnach den Beginn der exponentiellen Phase.

Zur Überprüfung der gleich eingesetzten cDNA Menge wurde während des qPCR-Laufs zusätzlich die Expression des Haushaltgens GAPDH (Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) gemessen.

Um die Proben-Gruppen zu normalisieren, wurden die c_T -Werte von den GAPDH Referenz c_T -Werten abgezogen: $\Delta c_T = c_T \text{ Zielgen} - c_T \text{ Referenzgen}$.

Anschließend wurde Δc_T auf die Kontrollgruppe (unbehandelte Proben) bezogen: $\Delta \Delta c_T = \Delta c_T \text{ behandelte Probe} - \Delta c_T \text{ Kontrolle (unbehandelte Probe)}$.

Für die graphische Darstellung der veränderten Genexpression wurde die n-fache Änderung verwendet: n-fache Änderung: $2^{-\Delta \Delta c_T}$

4.4 DNA Klonierung

4.4.1 Synthese von Oligonukleotiden

Das Design von Oligonukleotiden wurde mit Hilfe der Software Programme QuantPrime (quantprime.mpimp-golm.mpg.de) und „siteFind“ (mb.edu/scccbb/software/sitefind.html) entwickelt. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma „Thermo Fisher Scientific“ durch HPLC-Aufreinigung.

4.4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Vervielfältigung einer gewünschten DNA-Sequenz kann aus Matrizen-DNA ein Fragment mittels PCR amplifiziert werden.

Für die PCR wurde die Phusion® High-fidelity DNA-Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland) verwendet. Als Matrizen-DNA diente 10 ng Plasmid DNA pro Ansatz (4 µl 5x Phusion®HF Puffer, 12,4 µl H₂Oinj., 1 µl je Oligonukleotid (10 pmol/µl), 0,4 µl dNTPs (10 mM), 0,2 µl

Phusion® High-fidelity Polymerase (0,02 U/μl). Als Negativkontrolle diente ein PCR Ansatz mit 1 μl H₂O inj. anstatt Matrizen-DNA.

Die PCR wurde im Thermozykler durchgeführt (95°C – 10 min, 95°C – 45 Sek, 65°C – 45 Sek, 72°C – 2 min (x 30 Zyklen) 72°C – 10 min, 4°C ∞).

4.4.3 Mutagenese PCR

Für den Aminosäurenaustausch von rekombinanten pro-BMP-2 wurden entsprechende Basen (max. 3) ausgetauscht. Es wurden Oligonukleotide, die in der mittleren Sequenz die gewünschten Basen enthielten mit Hilfe des kostenlosen Softwareprogrammes „site find“ (www.utmb.edu/scccb/software/sitefind.html) entworfen. Optimal enthielten diese Oligonukleotide eine zusätzliche Schnittstelle für ein Restriktionsenzym, dass in der unmittelbaren Nähe des Basenaustauschs inseriert wurde. Dadurch konnte die Mutation mittels Restriktionsendonukleasen Verdau nachgewiesen werden. In der Mutagenese PCR wurde das zuvor konstruierte Plasmid mit der pro-BMP-2 Wildtyp Sequenz eingesetzt (10 ng/μl). Für den PCR Ansatz wurden 1 μl je Oligonukleotid (10 pmol/μl), 0,4 μl dNTPs (10 mM), 0,2 μl Phusion® High-fidelity DNA-Polymerase (0,02 U/μl) (Finnzymes, Espoo, Finnland), 4 μl 5 x Phusion®HF Puffer und 12,4 μl H₂O inj. verwendet. In der anschließenden PCR im Thermozykler (98°C - 5min, 98°C – 30 Sek, T_M (Oligonukleotidliste s.S. 26-27) – 30 Sek, 72°C- 7 min (x18 Zyklen) 72°C – 10 min, 4°C ∞) wurde das gesamte Plasmid amplifiziert. Um die neusynthetisierte von der Matrizen DNA zu trennen, wurde ein Restriktionsverdau mit DpnI durchgeführt (20 U DpnI/ 50 μl Ansatz; 2 h 37°C). DpnI restringiert nur methylierte DNA. Zur Inaktivierung der Nukleaseaktivität wurde der PCR Ansatz 10 min bei 65°C erhitzt. Es folgte die Plasmid Transformation in kompetente *E.coli* (Kapitel 4.4.9). Dazu wurde 5 μl des PCR Ansatz verwendet.

4.4.4 Aufreinigung von PCR Produkten

Die Aufreinigung von PCR Produkten erfolgte mit Hilfe des kits „PCR Purification Kit“ (QIAGEN, Deutschland) nach Herstellerangaben.

4.4.5 DNA Restriktion mit Endonukleasen

Für den enzymatischen Verdau wurden maximal 20 μg DNA in 100 μl Gesamtvolumen eingesetzt. Die Endonukleasen wurden mit 5 U Enzym/ μg DNA sowie 10 x Puffer nach Herstellerangaben (Fermentas, Deutschland) hinzugefügt und mindestens 2 h bei 37°C inkubiert.

4.4.6 DNA-Gelelektrophorese

Bei der DNA-Gelelektrophorese wird DNA auf der Basis ihrer Wanderungsgeschwindigkeit durch ein Gel unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes aufgetrennt und durch den DNA-interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid visualisiert.

Der TAE-Agarosegel Ansatz (TAE-Puffer 0,04 M Tris, 0,1 % Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0) wurde aufgekocht und anschließend 1-2 Tropfen Ethidiumbromid hinzugefügt. Für den Lauf wurde die Gelkammer mit TAE-Laufpuffer (TAE-Puffer 0,04 M Tris, 0,1 % Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0) befüllt, und eine Spannung von 90 V für ca. 45 min angelegt. Als DNA-Größenstandart diente der „100 Bp-Ladder“ (Fermentas, Deutschland). Zur Visualisierung der DNA-Banden wurde das Gel mit UV-Licht bestrahlt und mit mittels Geldokumentation (Intas Science Imaging) digital gespeichert.

4.4.7 Elution von Agarosefragmenten aus DNA-Gelen

Nach dem gelelektrophoretischen Lauf wurde die DNA unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend mit dem „QIAquick® Gel Extraction Kit“ (QIAGEN, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

4.4.8 DNA Ligation

Ziel der Ligation ist es, ein vollständiges Plasmid herzustellen, das ein bestimmtes Insertionsfragment mit der gewünschten Gensequenz enthält.

Für die Ligation von Vektor und Insertionsfragment wurde ein molares Verhältnis von 1:3 gewählt. Als Negativkontrolle wurde eine Religation des Vektors ohne Insert angesetzt.

Der Ligationssansatz (100 ng Vektor, 3x Molmenge Insert, 1 µl T4®-Ligase, 1 µl T4-Ligationspuffer, ad 10 µl H₂O, Fermentas, Deutschland) wurde über Nacht bei 7°C inkubiert. Die Ligase wurde anschließend inaktiviert (10 min 65°C).

4.4.9 Transformation von kompetenten *E.coli* Zellen

Für die Transformation wurden 5 µl DNA (50 ng/5 µl) in ein Reaktionsgefäß vorgelegt. Die kompetenten *E.coli* Zellen des Stammes XL1BLUE („α-Select Silver Efficiency“ Bioline, Deutschland) wurden auf Eis aufgetaut, und anschließend mit Plasmid-DNA inkubiert. Die Hitzeschock Transformation erfolgte nach Hersteller Angaben (Bioline, Deutschland). Zum Selektieren der positiven Transformanten wurden die Bakterien anschließend auf LB_A-Platten (1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, pH 7,2) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.4.10 DNA Sequenzierung

Die Sequenzierung der in dieser Arbeit hergestellten Plasmid DNA Konstrukte erfolgte durch die Firma „Seqlab“ Göttingen, Deutschland.

4.5 Zytologische Techniken

4.5.1 Immunozytochemie

C2C12 Myoblasten wurden auf 8-well Zellkultur Objektträger (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) kultiviert und stimuliert. Danach wurden die Zellen mit PBS-Puffer (0,137 M NaCl, 0,0027 M KCl, 0,0081 M NaH₂PO₄, 0,0018 M KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen und mit 4 % PFA (w/v) fixiert (5 min, RT). Zum Permeabilisieren der Zellen wurde eine 10-minütige 0,1 %ige Triton X-100 Behandlung (in TBS-T) (0,025 M Tris, 0,15 M NaCl, 0,002 M KCl, 0,0018 M KH₂PO₄, 0,1 % Tween-20, pH 7,4) vorgenommen. Die Zellen wurden 3 x mit TBS-T gewaschen und anschließend mit TBS-T + 3 % BSA (w/v) blockiert (1 h RT). Es folgte die Inkubation mit polyklonalen anti-BMP-2 Antikörper (Santa Cruz, USA) im Verhältnis 1:50 für 1 Stunde bei RT. Ungebundener Antikörper wurde durch 3-faches Waschen entfernt. Der FITC-konjugierte Sekundärantikörper (1:200; DAKO) wurde für 1 Stunde mit den Zellen inkubiert. Es wurde Gewaschen und Eingedeckelt („Vectashield“ Linaris, Wehrtheim, Bettingen, Deutschland) und mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) und dem Software-Programm Metamorph (Visitron, Puchheim, Deutschland) ausgewertet.

4.6 Statistische Auswertung

Zur statistischen Interpretation der Datensätze wurde das Softwareprogramm GraphPad Prism5 (Version 5.02) angewendet. Um die statistische Signifikanz zu ermitteln, wurde ANOVA (Analysis of variance) angewandt, und die Signifikanz durch den Bonferroni-Test überprüft. Signifikante Unterschiede der Datensätze traten bei $p < 0,05$ auf.

5 Ergebnisse

5.1 FSAP steigert die biologische Aktivität von BMP-2

Um eine mögliche Prozessierung von BMP-2 durch FSAP Behandlung zu ermitteln, wurde die Aktivität des Wachstumsfaktors mittels Differenzierung von Myoblasten in Osteoblasten analysiert. Dazu wurde die Induktion der alkalischen Phosphatase (ALP) als Reporterenzym gemessen. ALP ist ein Marker für den BMP-2 induzierten Differenzierungsprozess zu einem Osteoblast-ähnlichen Phänotyp (Kapitel 1.2). Als noch nicht ausdifferenzierte Zellen wurde die Myoblasten Zelllinie C2C12 verwendet (Katagiri et al., 1994).

BMP-2 (1 nM=13 ng/ml) wurde für 30 min bei 37°C mit FSAP (1 nM=65 ng/ml) vorbehandelt. BMP-2 wurde anschließend als Stimulus im Differenzierungsmedium der C2C12 Zellen verwendet. Nach 4-tägiger Inkubation wurde im Vergleich zu unbehandelten BMP-2 eine verstärkte Induktion der ALP ermittelt, was eine BMP Aktivierung durch FSAP rückschließen lässt (Abb.8 A). Enzymatisch inhibiertes FSAP, durch Zugabe des Serinprotease-Inhibitors Aprotinin, hatte keinen Effekt auf eine gesteigerte BMP Aktivität (Abb.8 A). Daher scheint die gesteigerte BMP Aktivität von der proteolytischen Aktivität der FSAP abhängig zu sein. FSAP oder Aprotinin allein hatte keinen Einfluss auf die BMP-2 induzierte ALP Induktion (nicht gezeigt).

Wurde FSAP mit seinem Kofaktor Heparin (Kannemeier et al., 2001) vorbehandelt, der die autokatalytische Aktivierung der FSAP steigern soll, war die BMP Aktivität jedoch reduziert (Abb. 8 B). Heparin allein hatte keinen Effekt auf die ALP Induktion (nicht gezeigt).

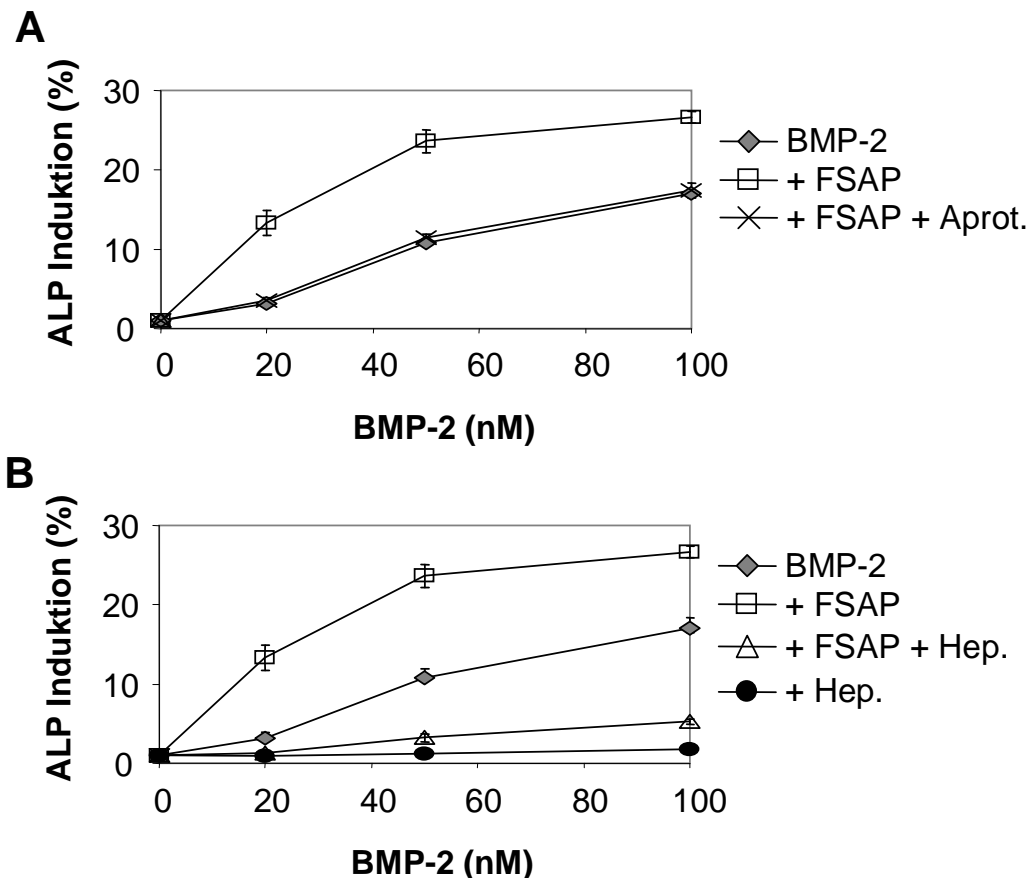


Abb. 8. FSAP verstärkt die biologische Aktivität von BMP-2. (A) 0-100 nM BMP-2 wurden mit FSAP (50 nM) oder FSAP mit Aprotinin (10 µg/ml) vorinkubiert (30 min 37°C) und anschließend C2C12 Myoblasten stimuliert und alkalische Phosphatase (ALP) Aktivität bestimmt. (B) Bestimmung der ALP in C2C12 Myoblasten nach Vorinkubation von BMP-2 (0-100 nM) und FSAP (50 nM) in Anwesenheit oder Abwesenheit von Heparin (25 µg/ml). Aprot=Aprotinin; Hep=Heparin

Diese FSAP induzierte BMP-2 Aktivitätssteigerung konnte sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig mittels ALP Aktivitätstest bestätigt werden (Abb. 9 A+B).

Bereits eine geringe FSAP Dosis von 0,1 nM führte zu einer BMP-2 Aktivitätssteigerung (Abb. 9 A). Auch im Zeitverlauf erwies sich eine 2-minütige Inkubation mit FSAP als wirksam (Abb. 9 B). Enzymatisch inhibiertes FSAP durch Aprotinin-Zugabe blieb in allen Experimenten ohne Effekte (Abb. 9 A+B).

Desweiteren konnte ermittelt werden, dass die durch FSAP gesteigerte BMP-2 Aktivität reversibel ist. Dies konnte durch Zugabe des extrazellulären BMP-2 Inhibitors Noggin (Kapitel 1.4.1) beobachtet werden. BMP-2 Inkubation mit Noggin inhibierte die ALP Induktion fast vollständig (Abb. 9 C). Bei Koinkubation mit FSAP war die Aktivität deutlich unter den unbehandelten BMP-2 Niveau, und stark reduziert im Vergleich zu BMP-2 und FSAP ohne den Inhibitor (Abb. 9 C). Demnach ist FSAP aktiviertes BMP-2 weiterhin inhibierbar durch Noggin.

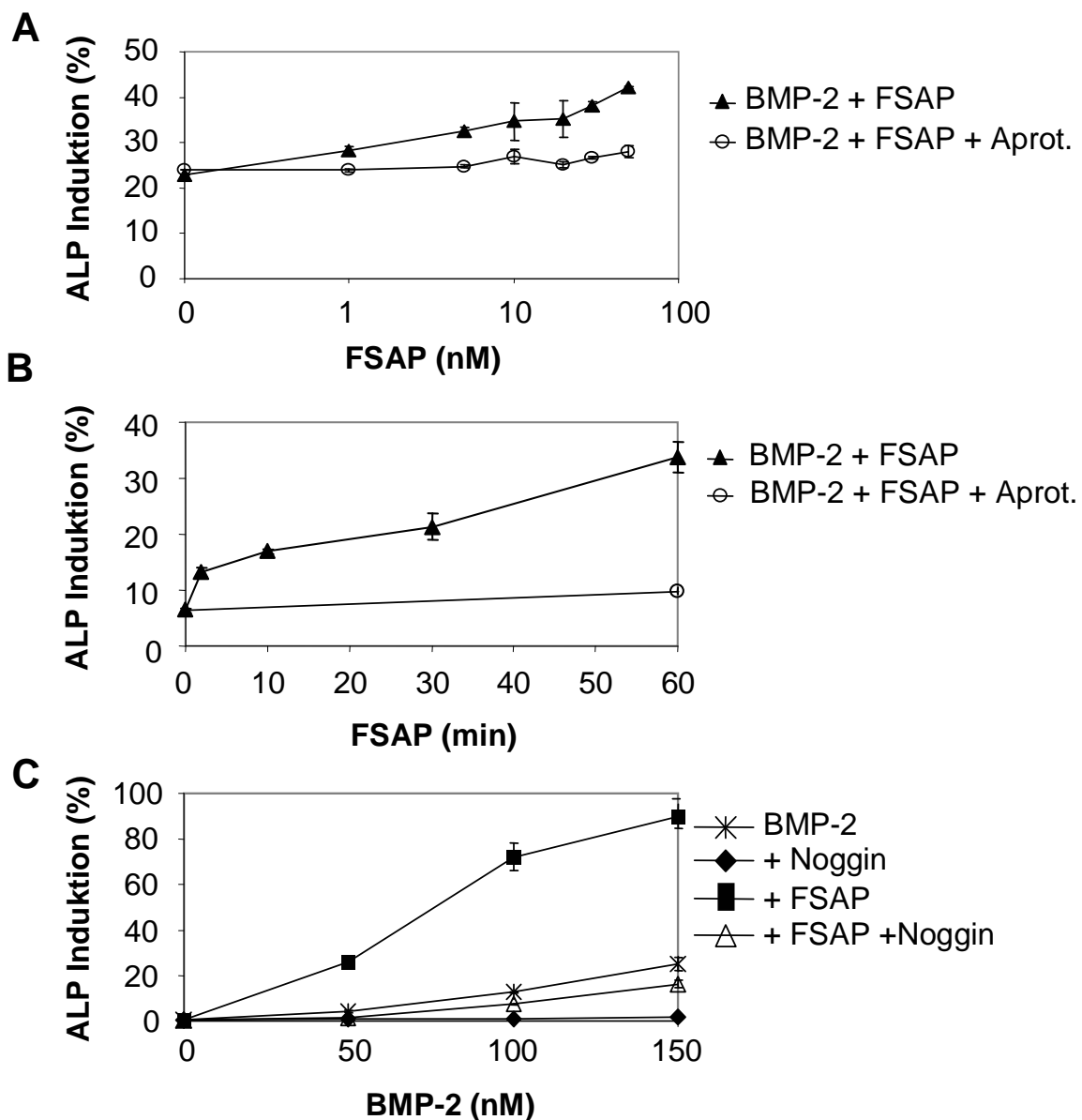


Abb. 9. Charakterisierung der Effekte von FSAP auf BMP-2. (A) BMP-2 (100 nM) wurde mit FSAP (0,1-50 nM) in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Aprotinin (10 µg/ml) vorinkubiert (30 min 37°C) und die C2C12 Differenzierung untersucht. (B) Zeitabhängige BMP-2 Aktivitätssteigerung nach FSAP Behandlung (50 nM). BMP-2 (100 nM) wurde für 0-60 min mit FSAP (50 nM) vorinkubiert (37°C) und die ALP Induktion bestimmt. (C) Der extrazelluläre BMP-Inhibitor Noggin revertiert den Effekt der FSAP auf BMP-2 Aktivitätssteigerung. Stimulierung mit BMP-2 (0-150 nM), FSAP (50 nM) und Noggin (50 nM). Aprot=Aprotinin. Daten repräsentieren 1 von 3 unabhängigen Experimenten.

Um die FSAP-induzierte Aktivitätssteigerung von BMP-2 auf molekularer Ebene zu erörtern, wurden die behandelten Proben mittels SDS-PAGE unter reduzierender Bedingung untersucht. Der Einfluss von FSAP, Aprotinin und Heparin auf BMP-2 wurde ermittelt. Western blot-Analyse mit polyklonalen anti-BMP-2 Antikörper zeigte die Entstehung eines kleineren Peptids (<13 kDa) nach FSAP Behandlung. Die Proteolyse war durch Zugabe von Heparin reduziert (Abb. 10 A). Eine Koinkubation mit Aprotinin inhibierte die BMP-2 Spaltung vollkommen (Abb. 10 A). Zur

genauen Analyse dieses prozessierten Peptids wurde Amino-terminale Sequenzierung der Aminosäuresequenz angewandt. Das 13 kDa Fragment wies die erwartete Sequenz der reifen BMP-2 Kette auf ($^{283}\text{QAKHK}$) (Abb. 6). Das kleinere Peptid war um 7 Aminosäuren gekürzt und startete mit $^{290}\text{KRLKS}$ (Abb. 10 B). Demnach prozessiert FSAP die reife BMP-2 Kette am N-Terminus (Abb. 10 C).

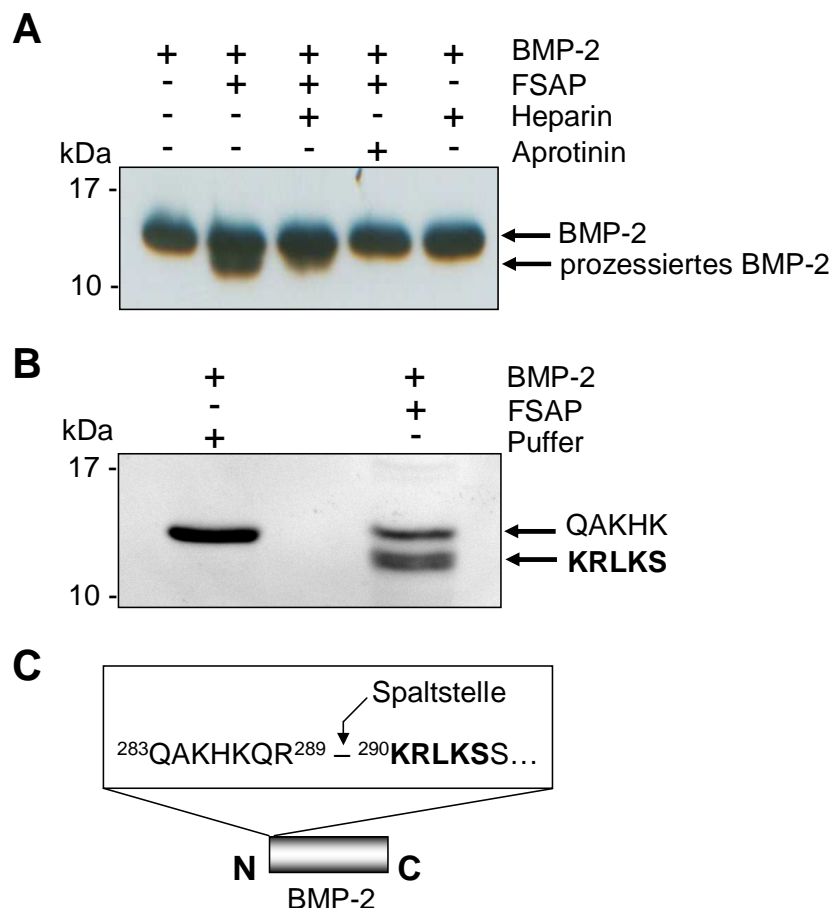


Abb. 10. FSAP spaltet BMP-2 am Amino-terminalen Ende. (A) BMP-2 wurde mit FSAP, Heparin oder Aprotinin behandelt (30 min 37°C). Nach FSAP Behandlung erscheint ein kleineres BMP-2 Fragment < 13 kDa (prozessiertes BMP-2). Die Zugabe von Heparin reduzierte die Prozessierung. Bei Aprotinin Behandlung wurde die Spaltung inhibiert. (B) Coomassie Färbung der PVDF-Membran. BMP-2 (5 µg) wurde mit FSAP (1 µg) inkubiert (2 h 37°C). Als Negativkontrolle der BMP-2 Prozessierung diente der Puffer von FSAP. N-terminale Sequenzierung der durch Pfeile gekennzeichneten Fragmente ergibt den Anfang der Polypeptidkette $^{283}\text{QAKHK}$ sowie ein um 7 Aminosäuren gekürztes Peptid (fett) mit dem Anfang $^{290}\text{KRLKS}$. (C) Schema der FSAP induzierten BMP-2 Prozessierung. FSAP spaltet bei der Position R²⁸⁹-K²⁹⁰ innerhalb einer Ansammlung von basischen Aminosäureresten. Numerische Angaben der Aminosäuren beziehen sich auf das unreife Gesamtproteine (Volllänge) (uniprot.org Eintrag P12643).

Der BMP-2 Amino-Terminus trägt viele basische Aminosäurereste (Kapitel 1.4.2), die womöglich für eine FSAP Bindung attraktiv erscheinen könnten.

Demnach spaltet FSAP das reife BMP-2 enzymatisch zu einer biologisch aktiveren Form. Diese gesteigerte biologische Aktivität kann durch Koinkubation mit Aprotinin oder Heparin gehemmt werden.

5.2 Analyse der Wirkung diverser Proteasen und BMP-2 Spaltung

Da es sich bei der FSAP um ein extrazelluläres zirkulierendes Protein handelt, sollte die Spezifität der BMP-2 Aktivierung mit anderen zirkulierenden Hämostasefaktoren verglichen werden. Schließlich handelt es sich bei dem strukturell verwandten Plasminogen ebenfalls um einen TGF- β -Aktivator (George et al., 2005).

Der Einfluss von Plasmin, Thrombin, Faktor VIIa, Faktor Xa sowie Aktiviertes Protein C (APC) wurde mit FSAP auf die BMP-2 Prozessierung verglichen.

Dafür wurde BMP-2 mit den oben genannten Proteasen behandelt (30 min 37°C). Die biologische Aktivität von BMP-2 in C2C12 Myoblasten wurde nur durch Plasmin und FSAP gesteigert (Abb. 11 A). Plasmin behandeltes BMP-2 war im Vergleich zu FSAP-behandelten BMP-2 etwas schwächer in der ALP Induktion (Abb. 11 A). Als Kontrolle wurden die Wirkungen der alleinigen Proteasen auf die ALP Induktion bestimmt. Sie erwiesen sich als nicht-induktiv (Abb. 11 B).

Die Western blot-Analyse mit polyklonalen anti-BMP-2 Antikörper zeigte die Generierung des prozessierten BMP-2 Peptids bei FSAP- sowie Plasmin-Behandlung (Abb. 11 C). Thrombin, FXa, FVIIa und APC Behandlung bewirkten keine BMP-2 Spaltung. Interessanterweise wies das Plasmin-prozessierte BMP-2 im Vergleich zur FSAP Behandlung ein Spaltprodukt mit noch kleineren Molekulargewicht auf (Abb. 11 C).

Diese Ergebnisse deuten auf eine hohe Substratspezifität hin. Die strukturell ähnlichen Serinproteasen FSAP und Plasmin verfügen über multiple Rollen in der Zirkulation (Hämostase, Wachstumsfaktor-Regulation), und ergänzen sich in ihrer Fähigkeit BMP-2 Aktivität zu fördern.

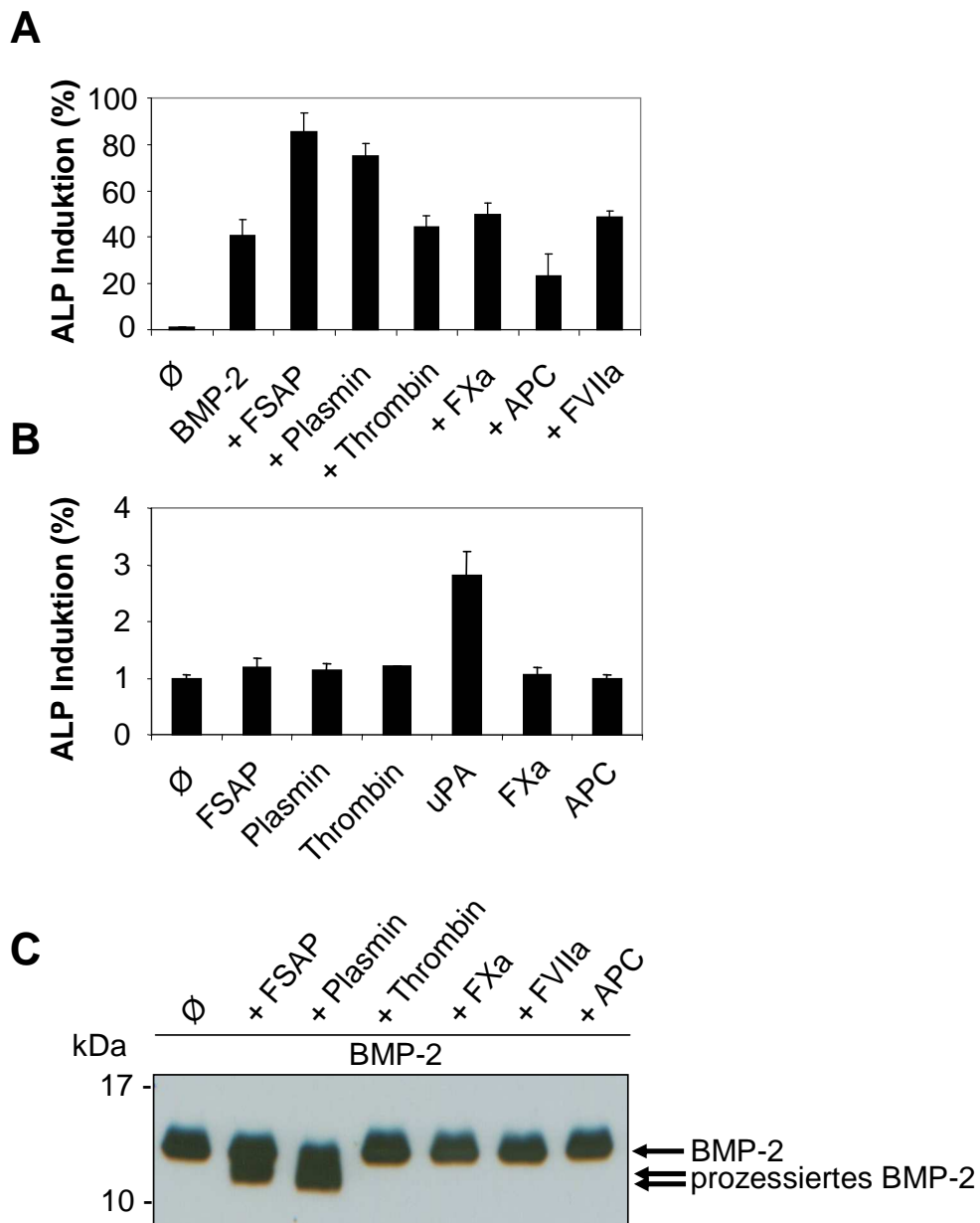


Abb. 11. Vergleichsstudie diverser Proteasen auf BMP-2 Aktivierung und Prozessierung. (A) Bestimmung der biologischen BMP-2 Aktivität (ALP Induktion) nach der Inkubation mit diversen Proteasen. (B) Behandlungskontrollen. ALP Induktion durch Stimulation von diversen Proteasen in Abwesenheit von BMP-2. (C) Western blot-Analyse mit polyklonalen anti-BMP-2 Antikörper. BMP-2 (100 nM) wurde mit verschiedenen Proteasen (50 nM) behandelt (30 min 37°C). Nach FSAP und Plasmin Inkubation erfolgt eine BMP-2 Prozessierung (unterer Pfeil) mit einem generierten Peptid < 13 kDa. Daten repräsentieren 1 von 3 unabhängigen Experimenten.

5.3 FSAP aktiviert die latente Proform von BMP-2

Durch die Erkenntnisse der vorherigen Kapitel, dass FSAP reifes BMP-2 in eine aktivere Form überführen konnte, sollte auch eine mögliche Prozessierung der inaktiven Proform von BMP-2 untersucht werden. Die Existenz und Prozessierung von sekretierten Proformen ist ebenso bedeutsam wie die extrazelluläre Regulation von reifen BMPs (Kapitel 1.4.2).

Wie bei der vorangegangenen Analyse in Kapitel 5.1 wurde nun die inaktive Proform von BMP-2 mit FSAP, Aprotinin oder Heparin vorinkubiert (30 min 37°C), und diese Stimulanzen in das Differenzierungsmedium der C2C12 Myoblasten hinzugefügt. Beim Aktivitätstest zeigte FSAP behandeltes pro-BMP-2 (1 nM=45 ng/ml) eine deutliche ALP Induktion im Vergleich zu unbehandelten pro-BMP-2, was auf eine Spaltung und Aktivierung rückschließen lässt. Enzymatisch inhibiertes FSAP, durch Aprotinin-Zugabe, reduzierte die ALP Induktion stark (Abb. 12 A). Aprotinin allein hatte keinen Effekt auf die ALP Induktion (nicht gezeigt). Pro-BMP-2 alleine löste bei einer Konzentration von 100 nM eine leichte ALP Induktion aus, was auf eine FSAP unabhängige Aktivierung rückschließen lässt. Heparin, bzw. Heparin in Kombination mit FSAP und pro-BMP-2 hatte nur einen sehr kleinen Effekt auf die ALP Induktion (Abb. 12 B). Diese Daten implizieren eine negative Wirkung von Heparin auf die pro-BMP-2 Aktivität. Die Kontrollbehandlung der Zellen, Heparin allein war ohne Effekt (nicht gezeigt). Demnach wirkt die Zugabe von Heparin inhibierend auf pro-BMP-2. Dies stimmt mit den Befunden der vorherigen Untersuchung zu reifen BMP-2 überein (Abb. 8).

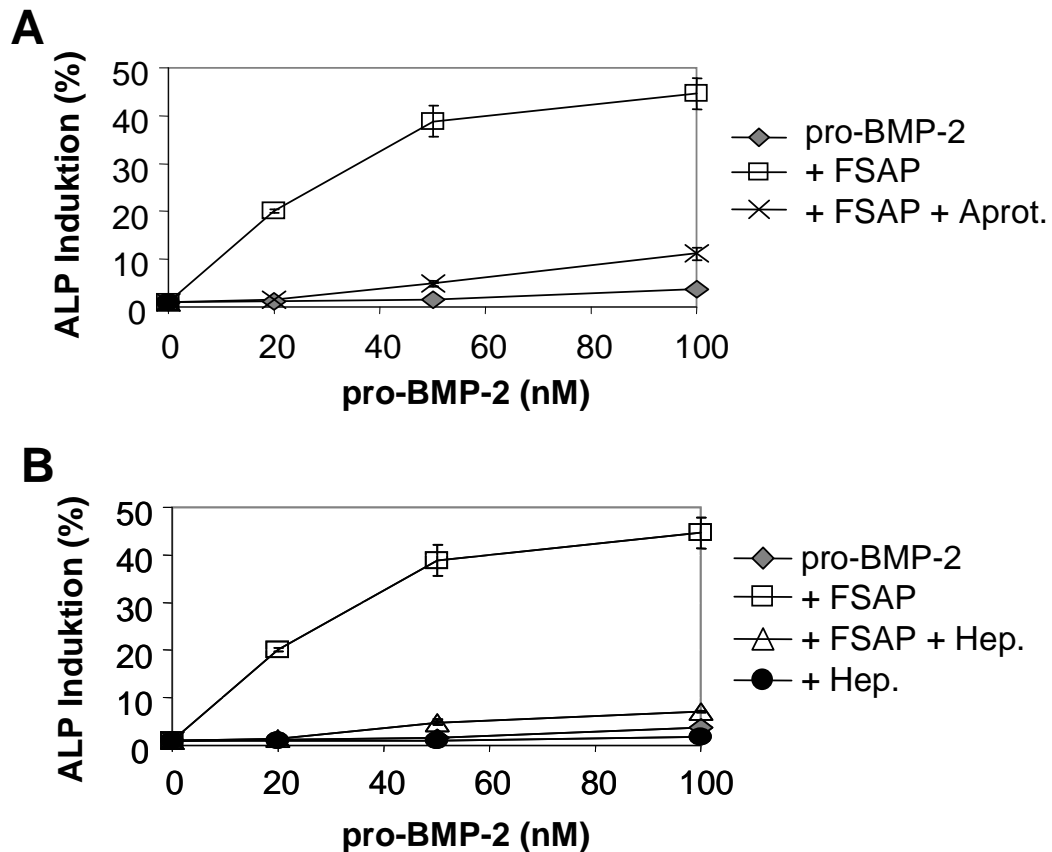


Abb. 12. FSAP führt zu einer Aktivierung der latenten Proform von BMP-2. (A) 0-100 nM pro-BMP-2 wurden mit FSAP (50 nM) in Anwesenheit oder Abwesenheit von Aprotinin (10 µg/ml) vorinkubiert (30 min 37°C) und die ALP Induktion der C2C12 Zellen bestimmt. (B) Bestimmung der ALP Induktion nach Vorinkubation von pro-BMP-2 (0-100 nM) mit FSAP (50 nM) in Anwesenheit oder Abwesenheit von Heparin (25 µg/ml). Aprot=Aprotinin; Hep=Heparin

Da wie bereits in Kapitel 5.1 beschrieben, eine FSAP induzierte Spaltung des reifen BMP-2 in zwei Peptide aufgezeigt wurde, wurde für pro-BMP-2 eine ähnliche Prozessierung vermutet.

Durch Western blot-Analyse konnte die Spaltung des großen pro-BMP-2 Proteins (45 kDa) in seinen reifen Monomer (13 kDa) unter reduzierenden Bedingungen beobachtet werden. Diese Spaltung war abhängig von der proteolytischen Aktivität von FSAP, da die Zugabe von PPACK-FSAP (irreversibler Inhibitor) zu keiner Spaltung führte (Abb. 13 A). Die Zugabe von Heparin zu pro-BMP-2 und FSAP blieb ohne Effekte. Heparin und pro-BMP-2 allein wies keine Spaltung auf, ebenso wie pro-BMP-2 mit FSAP Puffer (Abb. 13 A).

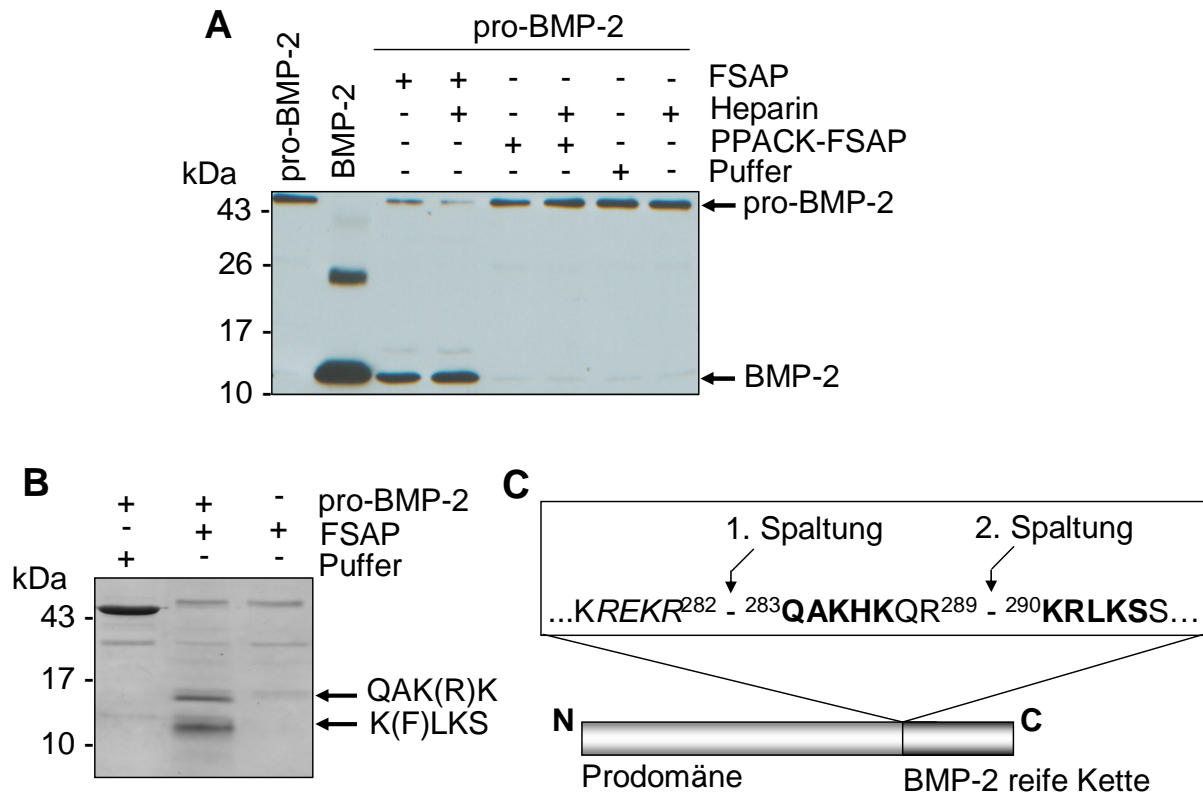


Abb. 13. Inaktives pro-BMP-2 wird durch FSAP in seine reife aktive Form gespalten. (A) Western blot-Analyse mit anti-BMP-2 Antikörper. Pro-BMP-2 wurde mit FSAP, Heparin, PPACK-FSAP oder FSAP Puffer inkubiert (2 h 37°C). Das 45 kDa große pro-Molekül (oberer Pfeil) wurde in das 13 kDa kleine reife Peptid (unterer Pfeil) gespalten. (B) Coomassie Färbung der PVDF-Membran nach Western blot. Pro-BMP-2 (5 µg) wurde mit FSAP (1 µg) inkubiert (2 h 37°C). Als Negativkontrolle der pro-BMP-2 Prozessierung diente FSAP Puffer. N-terminale Sequenzierung der durch Pfeile gekennzeichneten Fragmente ergab den Anfang der Polypeptidkette ²⁸³QAKHK sowie ein um 7 Aminosäuren gekürztes Peptid mit dem Anfang ²⁹⁰K(F)LKS. (C) Schema der FSAP induzierten BMP-2 Prozessierung. FSAP spaltet die Prodomäne (R²⁸²-Q²⁸³) sowie eine weitere Proteolyse der reifen Kette bei Position R²⁸⁹-K²⁹⁰. Das Furinspaltmotif RXXR ist kursiv markiert. Numerische Angaben der Aminosäuren beziehen sich auf das unreife Gesamtprotein (Volllänge) (uniprot.org Eintrag P12643).

Diese Befunde bestätigen die Relevanz der enzymatisch funktionellen FSAP in Bezug auf die pro-BMP-2 Aktivierung. Desweiteren ist die unveränderte pro-BMP-2 Spaltung in Anwesenheit von FSAP und Heparin ein Hinweis dafür, dass Heparin erst sekundär inhibierend wirkt. Die Spaltung wird hier auch in Anwesenheit von Heparin durchgeführt. Demnach scheint Heparin erst im zellulären System auf die BMP-2 Wirkung Einfluss zu nehmen (Abb. 12 B).

N-terminale Sequenzierung der generierten BMP-2 Peptide identifizierte die Produkte ²⁸³QAKHK sowie ²⁹⁰KRLKS (Abb. 13 B, C). FSAP generiert daher die natürlich vorkommende reife Polypeptidkette aus der inaktiven Proform und spaltet innerhalb der Furinspaltstelle RXXR (Abb. 6). Ein weiteres Spaltprodukt des reifen N-Terminus (²⁹⁰KRLKS) entspricht den Beobachtungen der reifen BMP-2 Prozessierung durch FSAP (Kapitel 5.1). Dieses generierte Peptid zeichnet sich durch gesteigerte biologische Aktivität aus.

Der biochemische Spaltungs- und Aktivierungsprozess wurde durch Western blot-Analyse und Aktivitätstests definiert. Die konzentrations- und zeitabhängige Spaltung und Aktivierung ist in Abb. 14 dargestellt. Bereits geringe Dosen von 1 nM FSAP führten zu einer pro-BMP-2 Spaltung (Abb. 14 A+B), sowie eine Inkubation nach 2 min (Abb. 14 C+D).

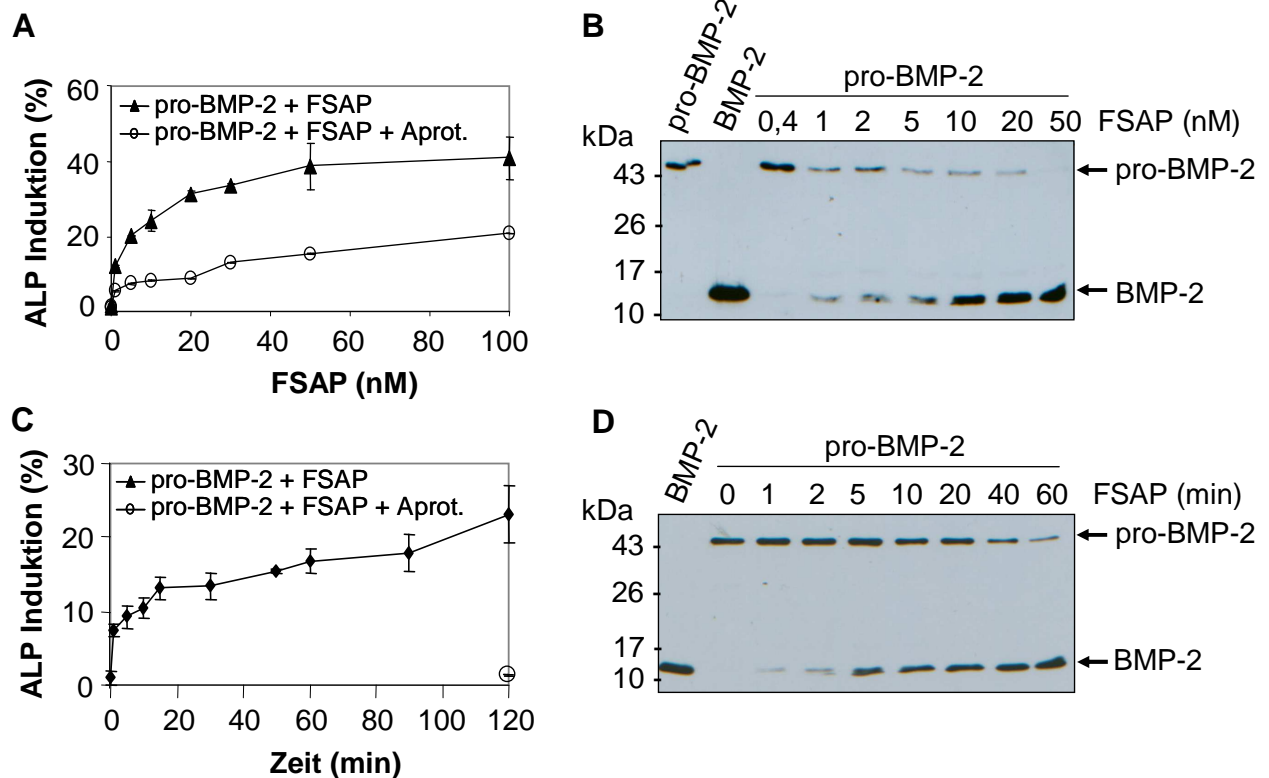


Abb. 14. FSAP aktiviert pro-BMP-2 konzentrations- und zeitabhängig. (A) Konzentrationsabhängiger Aktivitätstest durch Bestimmung der ALP in C2C12 Myoblasten. (B) Western blot-Analyse mit polyklonalen anti-BMP-2 Antikörper. Konzentrationsabhängige Spaltung des großen pro-BMP-2 Proteins (100 nM) durch FSAP (0,4-50 nM) Inkubation (45 kDa, oberer Pfeil) in die reife Form (13 kDa, unterer Pfeil) (C) Zeitabhängiger Aktivitätstest durch Bestimmung der ALP in C2C12 Myoblasten. (D) Western blot-Analyse mit polyklonalen anti-BMP-2 Antikörper. Zeitabhängige Spaltung von pro-BMP-2 (100 nM) durch FSAP (50 nM) Inkubation (1-60 min) in die reife Form (13 kDa, unterer Pfeil). Aprot=Aprotinin. Daten repräsentieren 1 von 3 unabhängigen Experimenten.

Aus diesen Experimenten geht FSAP als wichtiger extrazellulärer Aktivator von inaktiven pro-BMP-2 hervor, der im Zellkultursystem die osteogene Differenzierung in Myoblasten vorantreiben kann.

5.4 Analyse der der pro-BMP-2 Spaltung durch diverse Proteasen

Wie bei BMP-2 wurde auch für die Proform ein Aktivierungsvergleich mit diversen extrazellulären Proteasen (Kapitel 5.2) durchgeführt.

Der Aktivitätstest ergab, das Plasmin ebenfalls zur pro-BMP-2 Aktivierung führt (Abb. 15 A).

Mit Hilfe von Western blot-Analyse konnte ermittelt werden, dass das 45 kDa Proprotein durch FSAP, Plasmin und FXa prozessiert wurde (Abb. 15 B). Auffallend sind die unterschiedlichen Bandenmuster der Molekulargewichte. Im Vergleich zum reifen BMP-2 (entspricht dem Molekulargewicht von Produkt 1) entstehen nach den Proteasen Behandlungen unterschiedlich große Fragmente (Produkt 1 und 2). Im Falle von FSAP entstehen zwei Spaltprodukte (Produkt 1 und 2), dies korreliert mit dem Sequenzierungsergebnis ($^{283}\text{QAKHK}$ und $^{290}\text{KRLKS}$). Nach Plasmin Inkubation entsteht lediglich die kleinere Bande (Produkt 2). Zwar kommt es durch FXa Behandlung auch zu einer pro-BMP-2 Spaltung (Abb. 15 B), jedoch weist das generierte Produkt keine gesteigerte Aktivität im Zellkulturexperiment auf (Abb. 15 A).

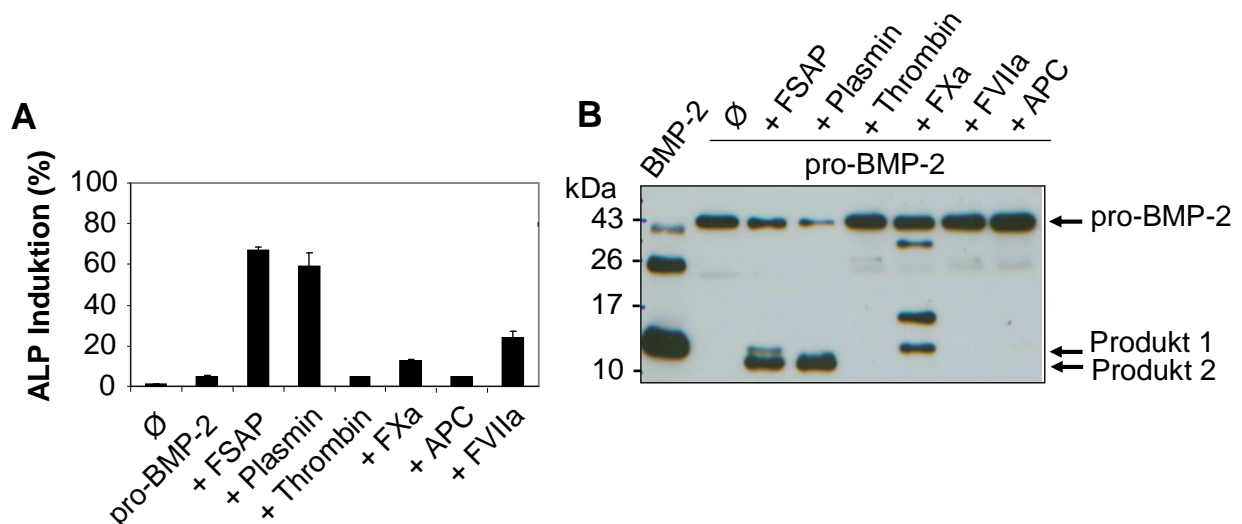


Abb. 15. Vergleich der pro-BMP-2 Aktivierung durch diverse Proteasen. (A) Aktivitätstest von behandelten pro-BMP-2 Proben und Bestimmung der ALP Induktion. (B) Western blot-Analyse mit polyklonalen anti-BMP-2 Antikörper von behandelten pro-BMP-2 mit diversen Proteasen (30 min 37°C). Die 45 kDa große Proform von BMP-2 wird durch FSAP, Plasmin und FXa prozessiert und ein kleines Peptid mit ähnlichem Molekulargewicht (~13 kDa) als reifes BMP-2 generiert (untere Pfeile). Daten repräsentieren 1 von 3 unabhängigen Experimente.

Aus diesen Untersuchungen erschließen sich FSAP und Plasmin als Aktivatoren von latenten pro-BMP-2. Dies ergänzt die Beobachtungen aus Kapitel 5.2, indem diese Serinproteasen bereits reifes BMP-2 spalteten und die biologische Aktivität steigerten. Desweiteren wurde nun Plasmin, eine neue *in vitro* Rolle in der BMP-2 und pro-BMP-2 Aktivierung zugewiesen.

5.5 Vergleich der FSAP und Plasmin induzierten BMP-Aktivierung

Um zu vergleichen, welche der Serinproteasen FSAP oder Plasmin stärkere Effizienz in der BMP-2 sowie pro-BMP-2 Prozessierung besitzt, wurde eine konzentrationsabhängige Vergleichsstudie durchgeführt.

Beim Aktivitätstest des behandelten reifen BMP-2 konnte sich erst ab der Konzentration von 1 nM Protease die FSAP als deutlicher Aktivierungsfaktor im Vergleich zu Plasmin herausstellen (Abb. 16 A).

Bei der pro-BMP-2 Aktivierung war die biologische Aktivität durch Plasmin initial verstärkt (0,1-0,8 nM Plasmin). Wie bei reifen BMP-2 kam es im Vergleich zu Plasmin ab einer Behandlung durch 1 nM FSAP zu einer stärker ausgeprägten pro-BMP-2 Aktivierung (Abb. 16 B).

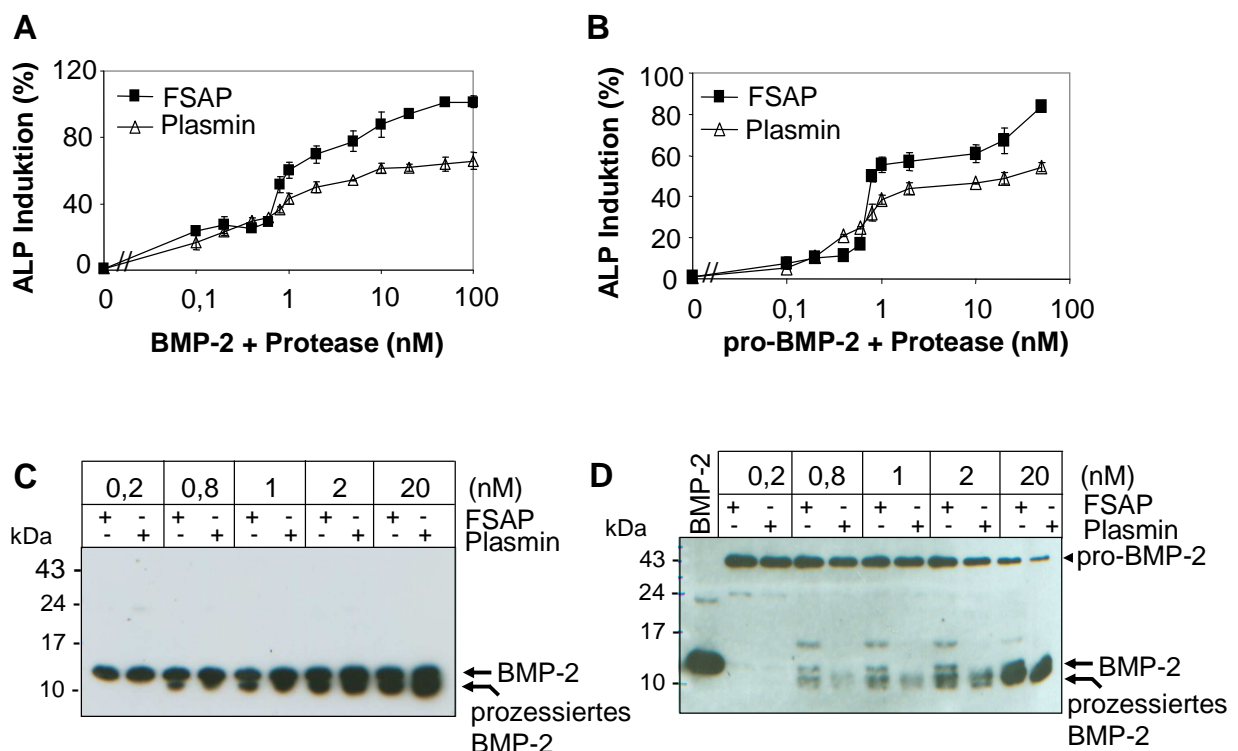


Abb. 16. Vergleich der FSAP und Plasmin induzierten BMP-Aktivierung. (A) Konzentrationsabhängige BMP-2 Aktivierung durch ALP Induktion in C2C12 Zellen. BMP-2 (100 nM) wurde mit FSAP oder Plasmin (0,1-50 nM) inkubiert (30 min 37°C) und C2C12 Myoblasten stimuliert. (B) Vergleich der FSAP und Plasmin induzierten pro-BMP-2 Aktivitätssteigerung in Konzentrationsabhängigkeit. (C) Western blot-Analyse der BMP-2 Spaltung mit anti-BMP-2 Antikörper der entsprechenden Proben aus (a). (D) Western blot-Analyse der konzentrationsabhängigen pro-BMP-2 Prozessierung durch FSAP und Plasmin. Daten repräsentieren 1 von 3 unabhängigen Experimenten.

Die Western blot-Analyse zeigte einen schnelleren Spaltungseintritt von BMP-2 und pro-BMP-2 nach FSAP Behandlung, im Vergleich zu Plasmin-Inkubation (Abb.16 C+D). Bei reifen BMP-2 kam es nach FSAP und Plasmin-Behandlung zu der Generierung des prozessierten BMP-2 Fragmentes (Abb. 16 C). Interessant war das unterschiedliche Bandenmuster bei der pro-BMP-2

Spaltung. Zu sehen waren wieder die zwei kleinen Spaltprodukte. Plasmin generiert nur die kleinere Bande (Abb. 16 D).

Um zu vergleichen, wodurch die veränderten BMP Aktivitäten durch FSAP- und Plasmin-Behandlung stammen, wurde Amino-terminale Sequenzierung der enzymatisch gespalteten BMPs durchgeführt.

Das BMP-2 Peptid wurde mit FSAP bzw. Plasmin inkubiert (2 h 37°C) und anschließend durch SDS-PAGE separiert und die Peptide auf PVDF-Membran transferiert und mit Coomassie visualisiert (Abb. 17 A).

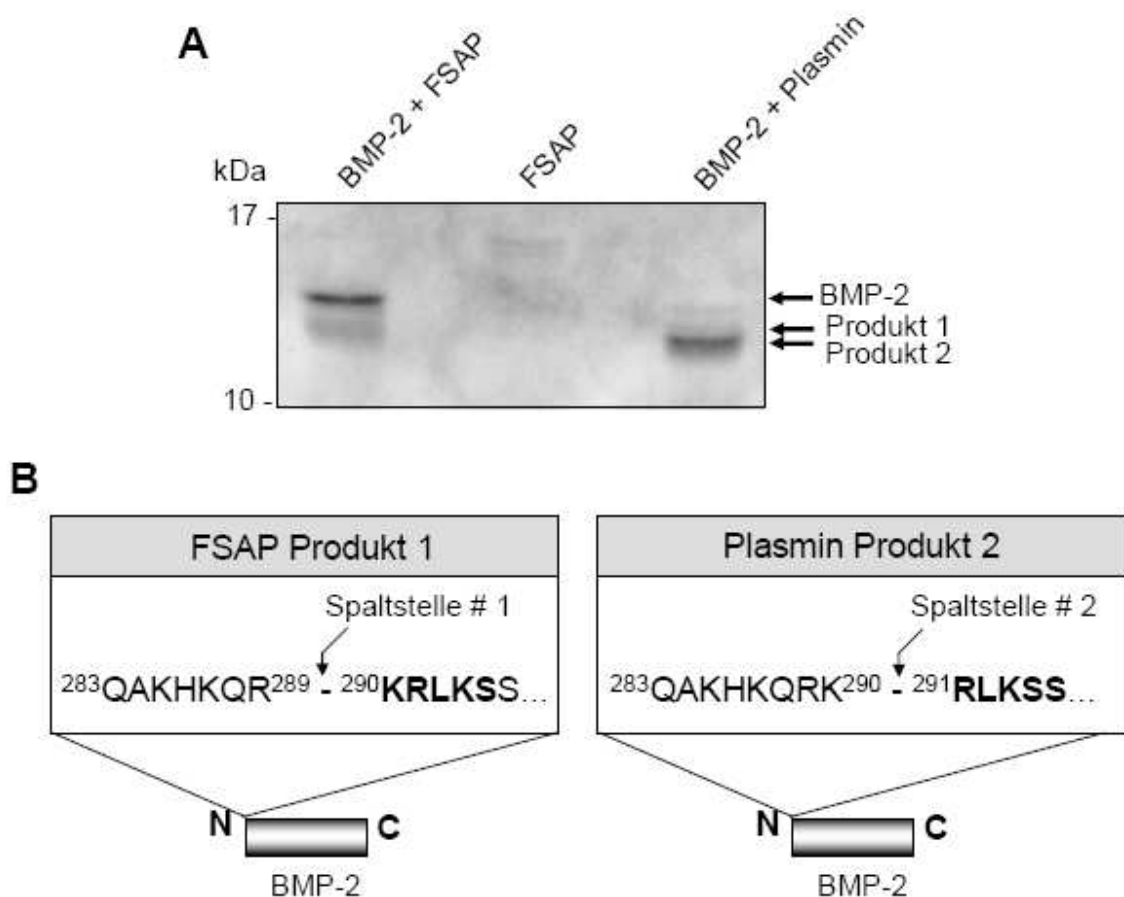


Abb. 17. Vergleich der FSAP und Plasmin induzierten Spaltung von BMP-2. (A) BMP-2 (5 µg) Inkubation mit entsprechender Protease (1 µg) (2 h 37°C). SDS-PAGE und anschließender Proteintransfer auf PVDF-Membran und Färbung mit Coomassie. Es sind zwei unterschiedliche Spaltprodukte (#1 FSAP und #2 Plasmin) zu erkennen. (B) Ergebnisse der N-terminalen Sequenzierung. Die Plasmin Schnittstelle ist im Vergleich zu FSAP um 1 Aminosäure versetzt. Numerische Angaben der Aminosäuren beziehen sich auf das unreife Gesamtprotein (Volllänge) (uniprot.org Eintrag P12643). Fett unterlegt sind die Ergebnisse der N-terminalen Sequenzierung (5 Schritte).

Im Vergleich zur FSAP Behandlung ist das Plasmin generierte Peptid (Produkt # 2) deutlich kleiner als das FSAP generierte (Produkt # 1) (Abb. 17 A). Die N-terminale Sequenzierung der Plasmin vermittelten BMP-Prozessierung ergab, dass Plasmin die reife BMP-2 Kette bei K²⁹⁰-R²⁹¹

spaltet, im Gegensatz zu FSAP ($R^{289}-K^{290}$) und somit um eine Aminosäure versetzt BMP-2 spaltet (Abb. 17 B).

Dieser Spaltungsvergleich wurde ebenfalls für latentes pro-BMP-2 durchgeführt (Abb. 18 A). Bei pro-BMP-2 wurde die gleiche Plasmin-Spaltstelle wie bei reifen BMP-2 identifiziert (Abb. 18 B). Diese Schnittstelle durch Plasmin unterscheidet sich um nur 1 Aminosäure von der FSAP induzierten Spaltstelle. Die pro-BMP-2 Spaltung innerhalb der Furinspaltstelle tritt nach Plasmin Inkubation nicht auf.

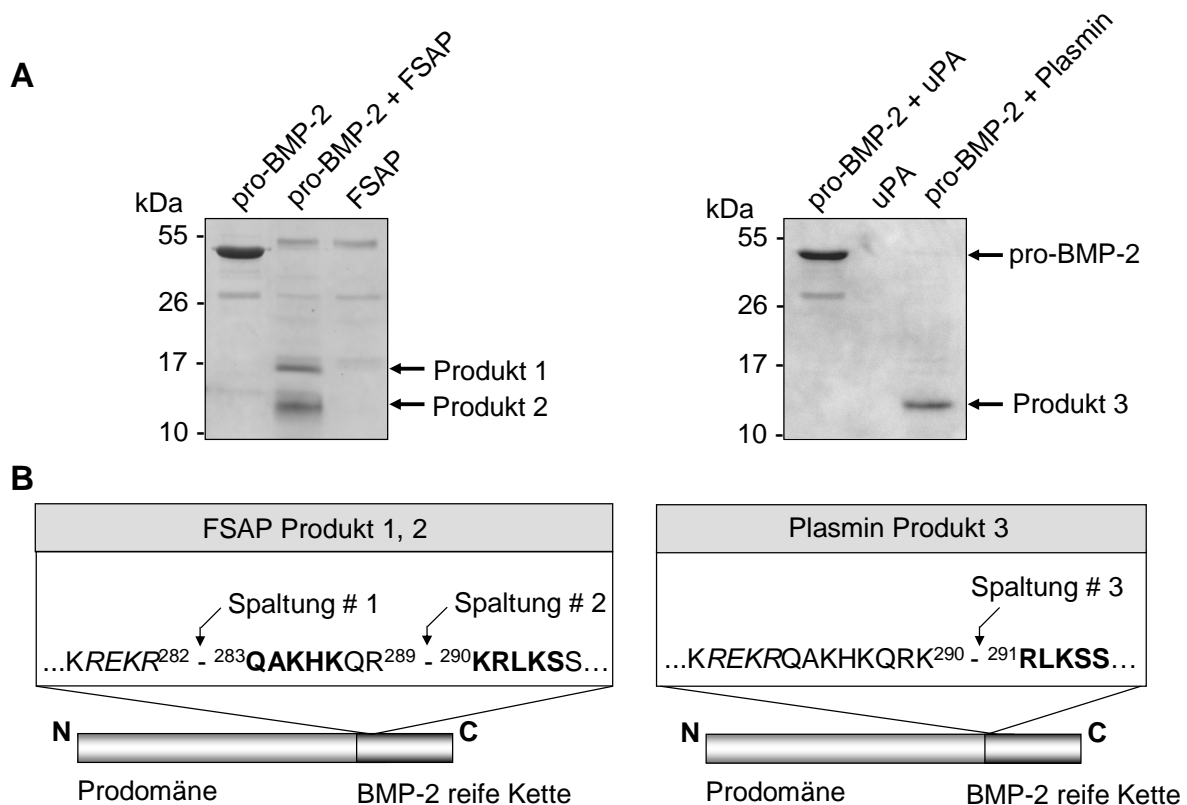


Abb. 18. Vergleich der FSAP und Plasmin induzierten Spaltung von pro-BMP-2. (A) Pro-BMP-2 wird durch FSAP und Plasmin gespalten. BMP-2 (5 µg) Inkubation mit entsprechender Protease (1 µg) (2 h 37°C) und SDS-PAGE und anschließendem Proteinttransfer auf PVDF-Membran sowie Färbung mit Coomassie. (B) Die Plasmin Schnittstelle ist um 1 Aminosäure versetzt im Vergleich zu FSAP. Das N-terminale Sequenzierungsergebnis ist fett angegeben und das RXXR Spaltungs-Erkennungsmotiv der Prodomäne ist kursiv eingezeichnet. Numerische Angaben der Aminosäuren beziehen sich auf das unreife Gesamtprotein (Volllänge) (uniprot.org Eintrag P12643). Fett unterlegt sind die Ergebnisse der N-terminalen Sequenzierung (5 Schritte).

Die biologische Aktivität des generierten Produkts zeigt jedoch deutliche Unterschiede auf. Um den BMP-Signalweg zu untersuchen, sollte im Folgenden die BMP-Rezeptoraktivierung und der daraus resultierenden intrazellulären Rezeptorkinase-Phosphorylierung analysiert werden.

5.6 FSAP steigert die Smad-abhängigen Proliferationsinhibierung sowie BMP-2 Akkumulation in C2C12 Myoblasten

Um den Signalweg der gesteigerten FSAP-vermittelten BMP-2 Aktivität zu untersuchen, wurde die intrazelluläre Phosphorylierung von Smad1/5/8 durch den ligandengebundenen BMP-Rezeptor (Kapitel 1.4.1) in Myoblasten analysiert.

BMP-2 bzw. pro-BMP-2 wurde für 30 min bei 37°C mit FSAP vorinkubiert und danach C2C12 Zellen stimuliert. Nach 30 min wurden die Zellen geerntet und durch Western blot-Methode mit polyklonalen anti-Phospho-Smad1/5/8 Antikörper analysiert. Zur Kontrolle diente unphosphorylierte anti-Smad1 Detektion als Proteinladekontrolle (Abb. 19 A+B)

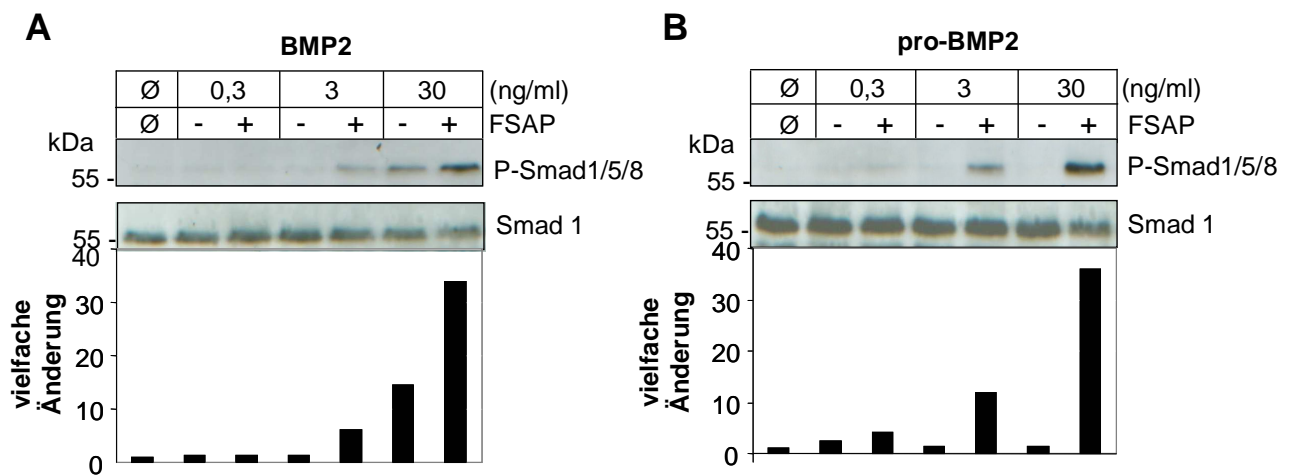


Abb. 19. Smad1/5/8 Phosphorylierung in BMP stimulierten C2C12 Myoblasten. (A) Western blot-Analyse der BMP-2 Behandlung mit FSAP (30 min bei 37°C) mit anschließender Stimulierung der C2C12 Zellen für 30min. Polyklonaler anti-Phospho-Smad1/5/8 Antikörper detektierte phosphorylierten Smad-Komplex. Anti-Smad1 Detektion dient als Ladekontrolle. Unten: densitometrische Auswertung des Western blot. (B) Western blot Analyse der Smad1/5/8 Phosphorylierung in C2C12 Myoblasten nach Stimulierung von FSAP behandelten pro-BMP-2. Unten: densitometrische Auswertung der Western blot-Analyse.

Die Zugabe von FSAP zu reifen BMP-2 verstärkte deutlich den Grad der Phosphorylierung (Abb. 19 A). Pro-BMP-2 ohne vorherige FSAP Behandlung blieb inaktiv und führte zu keiner Smad 1/5/8 Phosphorylierung (Abb. 19 B). Erst die Zugabe von FSAP führte zu einer Smad1/5/8 Phosphorylierung. Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass die FSAP induzierte BMP-2 Aktivitätssteigerung durch gesteigerte Signaltransduktion des aktivierten BMP-Rezeptors herführt. Neben der BMP-2 induzierten Transdifferenzierung der C2C12 Myoblasten oder VSMCs (Nakaoka et al., 1997) ist ebenfalls bekannt, dass diese ihr Zellwachstum einstellen, um den Differenzierungsprozess einzuleiten (Kapitel 1.4.1 und 1.4.3). Daher sollte der Einfluss von FSAP und BMP-2 auf die Proliferation von Myoblasten untersucht werden. Dazu wurde BMP-2 bzw. pro-BMP-2 mit FSAP in Anwesenheit/Abwesenheit von Heparin oder Aprotinin vorinkubiert (30

min bei 37°C) und C2C12 Zellen stimuliert (16 h). Mit Hilfe eines BrdU-Einbau ELISA wurde die DNA-Synthese ermittelt

Reifes BMP-2 ohne vorherige Behandlung hatte einen leicht inhibitorischen Effekt auf die Proliferation (Abb. 20). Nach Zugabe von FSAP wurde dieser inhibitorische Effekt deutlich verstärkt. Die Koinkubation mit Heparin bzw. Aprotinin hatte ebenfalls eine Reduktion zu Folge. Bei unbehandelten pro-BMP-2 gab es keinerlei Effekte im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. Erst nach Zugabe von FSAP wurde pro-BMP-2 aktiviert, und ein antiproliferativer Effekt war erkennbar. Dieser Effekt wurde durch Anwesenheit von Heparin bzw. Aprotinin leicht aufgehoben (Abb. 20).

Demnach fördert FSAP aktiviertes BMP-2 nicht nur die Differenzierung durch Induktion der ALP, sondern inhibiert auch die Proliferation der Zielzellen.

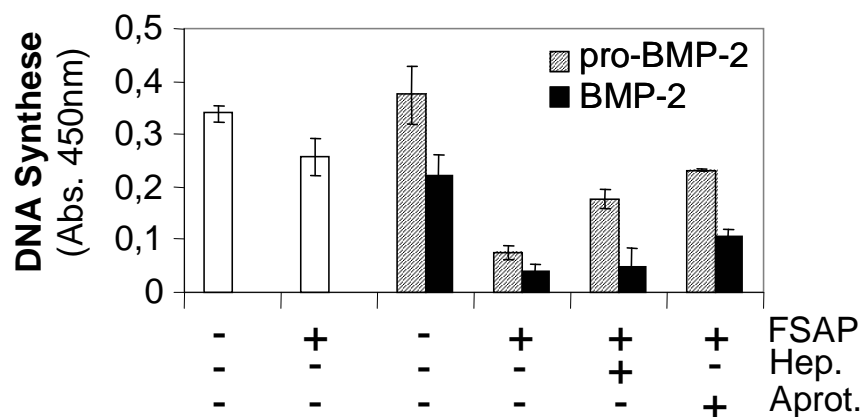


Abb. 20. Aktiviertes BMP-2 inhibiert die Proliferation in C2C12 Myoblasten. DNA-Synthese Bestimmung durch BrdU-Einbau ELISA. Nach 30-minütiger Vorinkubation von BMP-2 und pro-BMP-2 mit FSAP in Anwesenheit/Abwesenheit von Heparin und Aprotinin wurden C2C12 Myoblasten stimuliert und der BrdU DNA-Einbau nach 16h durch ELISA analysiert. Hep=Heparin, Aprot=Aprotinin

Da die BMP-2 Rezeptorbindung durch FSAP-Zugabe erhöht zu sein scheint (verstärkte Smad1/5/8 Phosphorylierung; Abb. 19), war es fraglich, ob das behandelte BMP-2 eine veränderte Zellassoziation besitzt. Daher wurde eine BMP-2 Lokalisationsstudie in C2C12 Myoblasten durchgeführt. Dafür wurden zunächst BMP-2 bzw. pro-BMP-2 mit FSAP oder Puffer für 30 min bei 37°C vorinkubiert, und danach für 24 h C2C12 Zellen stimuliert. Die Immunfluoreszenz-Analyse wurde mit Hilfe eines polyklonalem BMP-2 Antikörpers durchgeführt, der gegen den N-Terminus des reifen BMP-2 gerichtet ist, und daher nicht zwischen pro- und reifer BMP-2 Form unterscheiden kann.

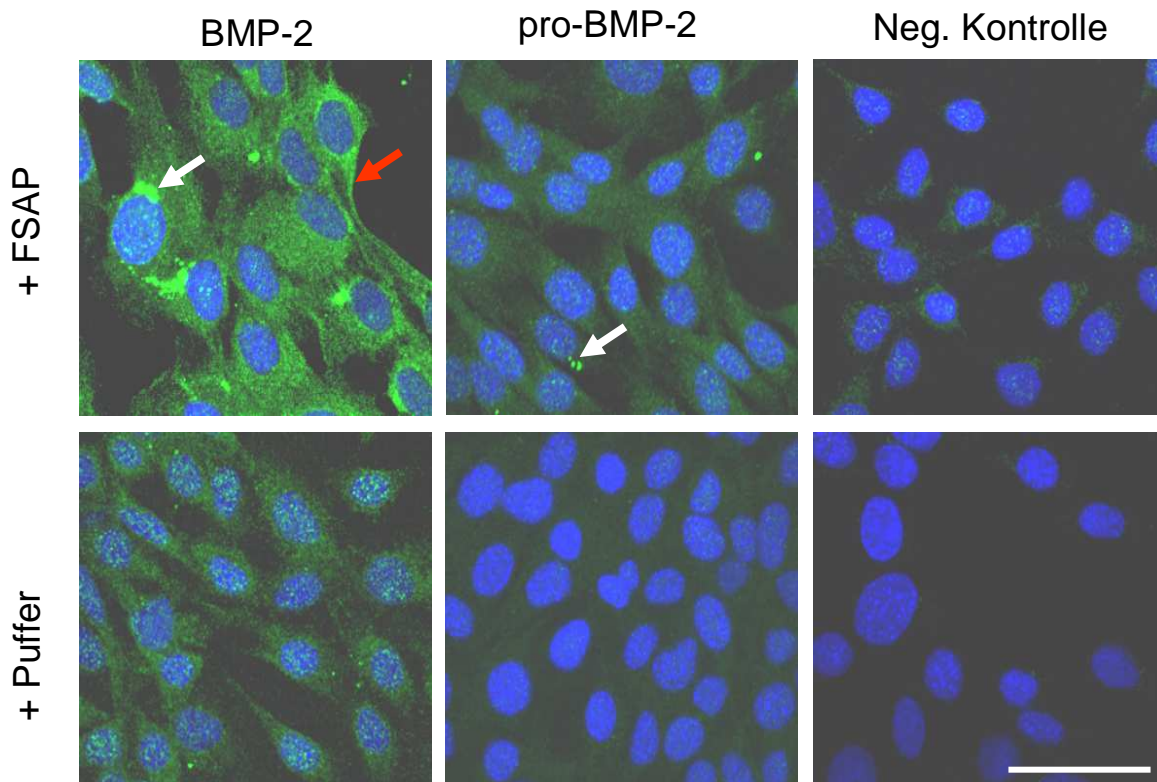


Abb. 21. FSAP stimuliert BMP-2 und pro-BMP-2 Akkumulation in Myoblasten. Lokalisation von BMP-2 nach Myoblasten Stimulierung. BMP-2 und pro-BMP-2 wurden mit FSAP oder FSAP Puffer vorinkubiert (30 min 37°C) und Myoblasten stimuliert. Nach Fixierung und Waschen der Zellen wurden diese mit anti-BMP-2 Antikörper gefärbt (grün) und die Nuklei mit Dapi (blau) visualisiert. Als Negativkontrolle wurde Kontroll-IgG verwendet. Skala entspricht 50 μ M.

Konfokale Mikroskopie der Immunfärbung ergab eine diffuse Lokalisation von BMP-2 nach Puffer Behandlung (Abb. 21). Dies lässt darauf schließen, dass die BMP-2 Anheftung nicht nur auf die Zellmembran (roter Pfeil) beschränkt war, wie man eine Bindung an die extrazelluläre Matrix oder an den BMP-Rezeptor vermuten würde, sondern auch endozytotisch aufgenommen wird (Hartung et al., 2006). Immunfluoreszenz war an der Zellmembran sowie im Zytoplasma als auch im Kern zu detektieren. Bei der Zusetzung von FSAP wurde die Immunfärbung nochmals verstärkt. Bemerkenswert war die BMP-2 Lokalisation um den Nukleus herum. Es waren auch kleine granuläre Strukturen innerhalb des Kerns sichtbar sowie Akkumulation um den Zellkern (weisser Pfeil) (Abb. 21).

Pro-BMP-2 mit Puffer Behandlung verhielt sich bei der Immunreaktion wie die Negativkontrolle (Kontroll-IgG). Nach Zugabe von FSAP war die diverse Lokalisation von aktivierten pro-BMP-2 jedoch zu erkennen. Ähnlich wie bei reifen BMP-2 kam es hier zur Lokalisation an der Zellmembran, im Zytoplasma, sowie im Zellkern und granuläre Strukturen am Zellkern (weisser Pfeil) (Abb. 21).

Es scheint daher, als würde BMP-2 nach FSAP Vorbehandlung stärker in die Zelle aufgenommen werden. Dies lässt die Hypothese entstehen, ob endozytiertes BMP-2 auch in den Nukleus wandert und dort als eigener Transkriptionsfaktor wirkt (Felin et al., 2012).

5.7 Bindungsstudie von FSAP an BMP-2 und pro-BMP-2

Die große Prodomäne der TGF- β Superfamilienmitglieder übt im Extrazellulärraum eine wichtige Rolle für die Anheftung an Oberflächen, wie Matrixkomponenten oder Liganden aus (Kapitel 1.4.2).

Da diese Struktur auch stöchiometrisch den direkten Zugang zum reifen Peptid beeinflusst, sollte in einer Bindungsstudie untersucht werden, ob FSAP unterschiedliche Affinitäten zu reifen BMP-2 bzw. der Proform aufweist.

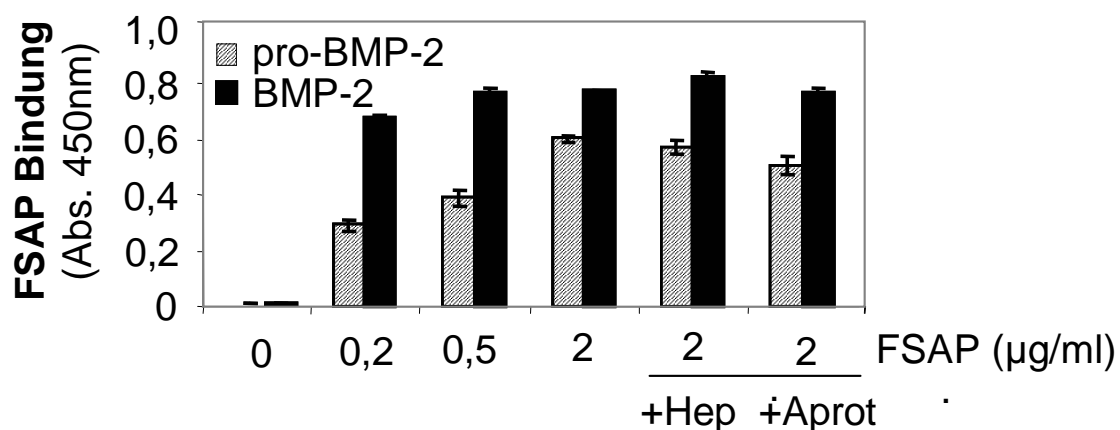


Abb. 22. FSAP-Bindungsstudie an immobilisiertes BMP-2 und pro-BMP-2. BMP-2 oder pro-BMP-2 wurde auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit steigender Konzentration von FSAP (0,2-2 µg/ml) inkubiert. Aprotinin (10 µg/ml) sowie Heparin (25 µg/ml) wurden ebenfalls koinkubiert. Nach intensiven Waschen wurde gebundenes FSAP durch anti-FSAP Antikörper mittels ELISA gemessen. Daten repräsentieren 1 von 2 unabhängigen Experimenten. Hep= Heparin, Aprot=Aprotinin

Es gab keine konzentrationsabhängige Bindung von FSAP an immobilisiertes pro-BMP-2 (Abb. 22). Die Koinkubation mit Heparin bzw. Aprotinin hatte keinen Einfluss auf die FSAP-Bindung. Anders verhielt es sich bei immobilisierten pro-BMP-2. Hier kam es zu einer konzentrationsabhängigen Bindung der FSAP an die Proform. Die Bindung war allerdings geringer im Vergleich zu reifen BMP-2. Wie bei reifen BMP-2 hatte auch hier die Koinkubation mit Heparin bzw. Aprotinin keinen Effekt auf die FSAP-Affinität (Abb. 22).

Dies lässt darauf schließen, dass beim Vergleich zum kurzen reifen BMP-2 Peptid, die große Prodomäne inhibierend auf die FSAP-Bindung wirken könnte. Die proteolytische Aktivität der FSAP scheint für die Ligandenbindung nicht essentiell zu sein.

5.8 Endogene FSAP und die BMP-2 Prozessierung in Hepatozyten

Nachdem der Wirkungsmechanismus von exogener FSAP auf die BMP-2 Aktivierung in C2C12 Myoblasten untersucht wurde, sollte nun der Effekt von endogener FSAP analysiert werden.

Um die bestmögliche Ausbeute an exprimierter FSAP zu erhalten, wurde ihr Hauptsyntheseort, Hepatozyten, verwendet. Es wurden murine Hepatozyten (AML12) zur Untersuchung herangezogen.

Eine Herunterregulation der FSAP mRNA wurde durch *HABP2* siRNA-Transfektion induziert. Um Nebeneffekte auszuschließen, wurden die Zellen mit Negativkontroll siRNA transfiziert (24 h) und serumfrei gehalten. Anschließend wurden die Zellen mit pro-BMP-2 stimuliert (30 min und 4 h), und die Kulturüberstände mittels Western blot-Analyse auf eine Proteinspaltung untersucht. Bereits nach 30min Stimulation war eine vollständige Spaltung von pro-BMP-2 in die reife Form zu detektieren, was jedoch nicht bei *HABP2*-siRNA-Transfektion statt fand (Abb. 23 A). Lediglich nach einer 4-stündigen Stimulation konnte auch die prozessierte Form im Überstand der *HABP2*-siRNA transfizierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 23 A unten). Dies deutet darauf hin, dass die Anwesenheit von endogenen FSAP wichtig für die pro-BMP-2 Spaltung ist. Um zu überprüfen, ob die siRNA Transfektion auf Proteinebene erfolgreich war, wurde FSAP Protein in den transfizierten Kulturüberständen nachgewiesen. Im Vergleich zu den mit Negativkontroll siRNA behandelten Zellen (NK) ist die FSAP Proteinmenge deutlich verringert (Abb. 23 B). Daher kann davon ausgegangen werden, dass endogene FSAP für die Prozessierung des Wachstumsfaktors wichtig ist.

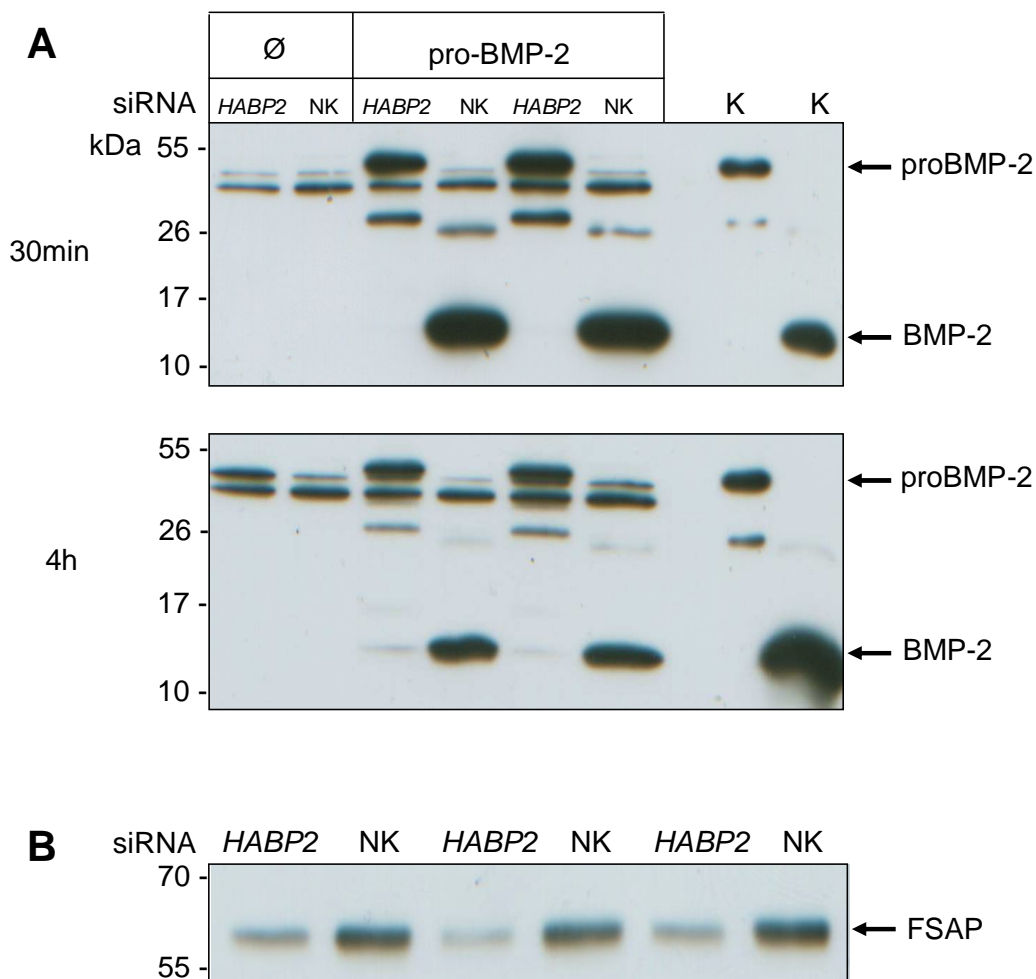


Abb. 23. Endogenes FSAP spaltet pro-BMP-2 bei AML12 Zellen. (A) Western blot-Analyse mit polyklonalen anti-BMP-2 Antikörper der stimulierten Kulturüberstände von AML12 Zellen. AML12 Zellen wurden mit siRNA transfiziert (*HABP2* und Negativkontroll (NK) siRNA) und nach 24 Stunden mit pro-BMP-2 stimuliert (30 min und 4 h). Bereits nach 30 min Inkubation (oberes Bild) war eine vollständige pro-BMP-2 Spaltung in Kontroll behandelten Zellen zu detektieren, wohingegen eine FSAP Herunterregulation zu keiner Spaltung führte. Nach 4 h Inkubation war auch in diesen Zellen eine leichte pro-BMP-2 Spaltung nachzuweisen (unteres Bild). Zum Größenvergleich wurden als Kontrollgrößen (K) BMP-2 und pro-BMP-2 dargestellt. (B) Western blot Analyse der transfizierten Zellen und Bestimmung von FSAP Protein in den Überständen mit polyklonalen FSAP Antikörper. Daten repräsentieren 1 von 4 unabhängigen Experimenten.

Um den biologischen Effekt der durch endogenes FSAP prozessierte pro-BMP-2 zu ermitteln, wurde die mRNA des BMP-2 Zielgens Hecpudin in Hepatozyten bestimmt. Hecpudin ist ein natürliches Zielgen von BMPs in der Leber, und spielt für den Eisenmetabolismus eine wichtige Rolle (Kapitel 1.4.3). Die Stimulierung mit BMP-2 und pro-BMP-2 führte nur in Kontroll siRNA transfizierten Zellen zu einer gesteigerten Hecpudin-Induktion (Abb. 24 A), was mit der Protein-Spaltung (Abb. 23 A) korreliert. Demnach führt endogene FSAP zur Spaltung und signifikanten Aktivierung von pro-BMP-2. Als Nachweis einer erfolgreichen FSAP mRNA Herunterregulation durch *HABP2* siRNA wurde die FSAP mRNA bestimmt. Quantitative Realtime PCR ergab eine signifikante Herunterregulation der FSAP mRNA, wohingegen Kontroll siRNA zu keiner FSAP-

Erniedrigung führte (Abb. 24 B). Dies ergänzt die Befunde der FSAP Herunterregulation auf Proteinebene (Abb. 23 B) auf mRNA Ebene (Abb. 24 B).

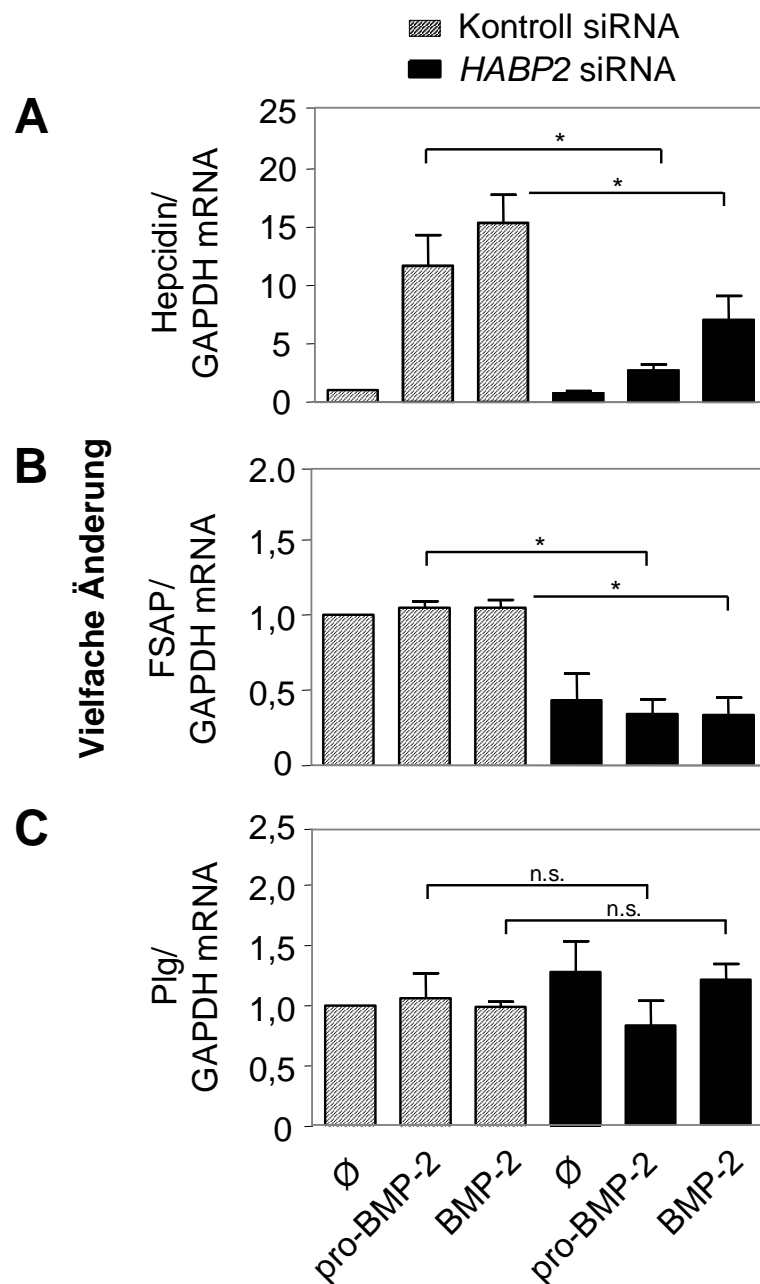


Abb. 24. Herunterregulation von FSAP durch siRNA in AML12 Zellen und BMP-2 Aktivierung. AML12 Zellen wurden mit *HABP2* siRNA oder Negativkontroll siRNA transfiziert und nach 24 h mit BMP-2 und pro-BMP-2 stimuliert (4 h). Quantitative Bestimmung der Hepcidin mRNA Expression (A), der FSAP mRNA Expression (B) sowie zur Kontrolle die unveränderte Plasminogen (Plg) mRNA Expression (C) durch qPCR. Daten repräsentieren Mittelwerte mit +/-SEM (n= 4; *p < 0,05 n.s.= nicht signifikant).

Um auszuschließen, ob durch die FSAP Herunterregulierung Kompensationseffekte auftreten, wobei andere Proteasen gehäuft exprimiert werden, wurde die Genexpression von Plasminogen überprüft, da es sich hier auch um einen BMP-2 Aktivator handelt (Kapitel 5.2). Die mRNA

Analyse ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede der Plasminogen Expression in Kontroll- und *HABP2*-siRNA transfizierten Zellen (Abb. 24 C).

Aus diesen Befunden scheint endogene FSAP eine Bedeutung für die BMP-2 Aktivitätssteigerung und pro-BMP-2 Spaltung zu haben.

5.9 BMP-2 Aktivierung in VSMCs durch FSAP

Da die FSAP Proteinaktivität auch in Korrelation zu vaskulärer Kalzifizierung und Arteriosklerose steht, und VSMCs zu den Zielzellen der vaskulären BMP-Funktion gehören (Kapitel 1.2 und 1.4.3), sollte der Einfluss der FSAP auf BMP-2 stimulierte VSMCs analysiert werden.

VSMCs wurden mit BMP-2 bzw. pro-BMP-2 sowie FSAP in Anwesenheit/Abwesenheit von Heparin stimuliert, und anschließend die rezeptorvermittelte Smad1/5/8-Phosphorylierung bestimmt. Eine Koinkubation mit Heparin reduzierte die Smad-Phosphorylierung durch BMP-2 (Abb. 25 A). Diese Effekte waren bei der Zellstimulation durch latentes pro-BMP-2 noch deutlicher. Pro-BMP-2 alleine übte keine Rezeptoraktivierung aus, nach FSAP Zugabe war die Smad1/5/8-Phosphorylierung jedoch deutlich messbar (Abb. 25 B).

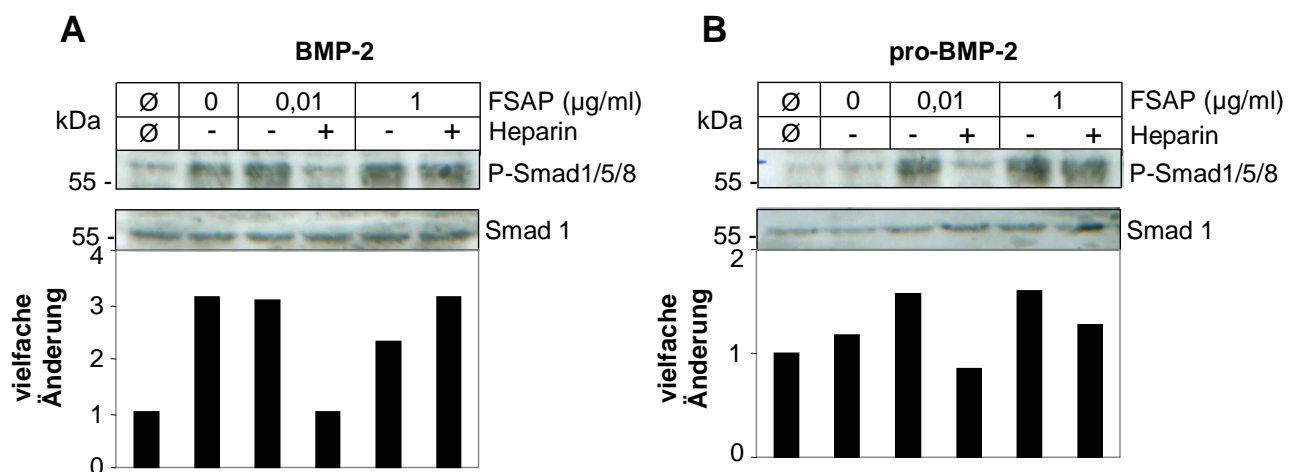


Abb. 25. Smad1/5/8 Phosphorylierung in stimulierten VSMCs. (A) Western blot-Analyse durch Anti-Phospho-Smad1/5/8 Antikörper. BMP-2 wurde mit FSAP (0,15 und 1 nM) in Anwesenheit/Abwesenheit von Heparin (25 µg/ml) 30 min bei 37°C vorinkubiert. Nach 30-minütiger Stimulation von VSMC wurden die Zellextrakte geerntet. (B) Western blot-Analyse der stimulierten VSMCs mit pro-BMP-2 und FSAP sowie Koinkubation mit Heparin. Als interne Ladekontrolle der Zellextrakte diente anti-Smad 1 Antikörper.

Nachdem nun belegt wurde, dass FSAP einen positiven, verstärkenden Effekt auf die BMP-2 Signaltransduktion in VSMCs hat, sollte nun die Induktion der typischen BMP-2 Zielgene in stimulierten VSMCs analysiert werden.

Zu diesen gehören, wie in der Einleitung Kapitel 1.4.1 bereits beschrieben, Id1 und inhibitorisches Smad6.

Nach 4-stündiger Stimulation der Zellen mit BMP-2 bzw. pro-BMP-2 und FSAP wurde eine mRNA-Analyse dieser Genprodukte durchgeführt.

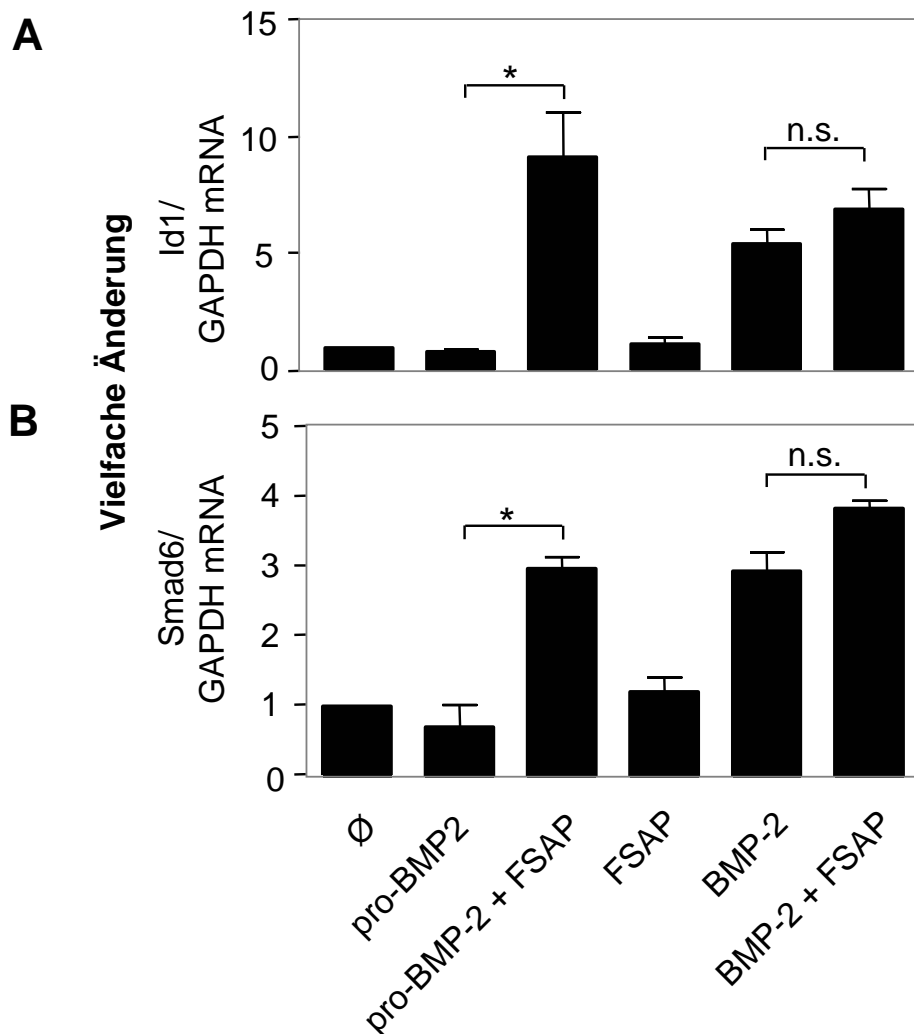


Abb. 26. FSAP aktiviert BMP-2 und steigert die Expression der Zielgene in VSMCs. Quantitative Realtime PCR der stimulierten VSMCs nach 4 h. BMP-2 wurden mit FSAP vorinkubiert (30 min 37°C) und anschließend VSMCs stimuliert. Die mRNA Expression des BMP-2 Zielgene Id1 (**A**) und Smad6 (**B**) wurde mit interner GAPDH Expression kontrolliert. Daten repräsentieren Mittelwerte mit +/- SEM (n= 3; *p < 0,05, n.s.=nicht signifikant).

Quantitative Realtime PCR zeigte eine positive Wirkung der FSAP-erhöhten BMP-2 Aktivität durch Hochregulierung von Id1 mRNA (Abb. 26 A). Pro-BMP-2 alleine blieb inaktiv und es kam zu keiner Id1-Expression, wohingegen die Zugabe von FSAP pro-BMP-2 signifikant aktivierte. Als Kontrolle wurde FSAP allein eingesetzt. Die Protease hatte keinen Einfluss auf die Id1-Expression (Abb. 26 A).

Ein ähnliches Muster wurde bei der Analyse von Smad6 mRNA festgestellt. Auch hier wurde durch die Zugabe von FSAP die BMP-2 Aktivität, und somit die Smad6 mRNA Expression erhöht. Pro-BMP-2 konnte erst durch vorherige FSAP-Aktivierung Smad6 induzieren (Abb. 26 B). Diese Ergebnisse ergänzen die zellulären Effekte von BMP-2, die in dieser Arbeit bereits in Myoblasten und Hepatozyten demonstriert wurden. In allen Fällen wird die BMP-2 Aktivität durch FSAP-Zugabe verstärkt. Die durch FSAP verstärkende BMP-2 Wirkung auf VSMCs könnte ein Hinweis auf eine Rolle der FSAP in der vaskulären Kalzifizierung sein.

5.10 Expression und Aktivität von rekombinanten Wildtyp und mutierten pro-BMP-2

Um die Interaktion zwischen endogenen pro-BMP-2 und FSAP in Detail zu untersuchen, wurde rekombinantes pro-BMP-2 in HEK293 Zellen exprimiert.

Als Ausgangsprodukt für die Klonierung wurde das Plasmid pET11a_pro-BMP-2 mit der humanen pro-BMP-2 cDNA Sequenz verwendet. Mittels PCR wurde die pro-BMP-2 Sequenz amplifiziert und durch angefügte *Bam*HI und *Hind*III Restriktionsenzym-Schnittstellen in das Plasmid pSecTag2A hineinkloniert (pSec_Tag2A_pro-BMP-2) (Abb. 27). Der Vektor enthält eine zusätzliche Präsequenz nach dem Startkodon ATG, die eine Sekretion in den Kulturüberstand fördern soll (Abb. 27).

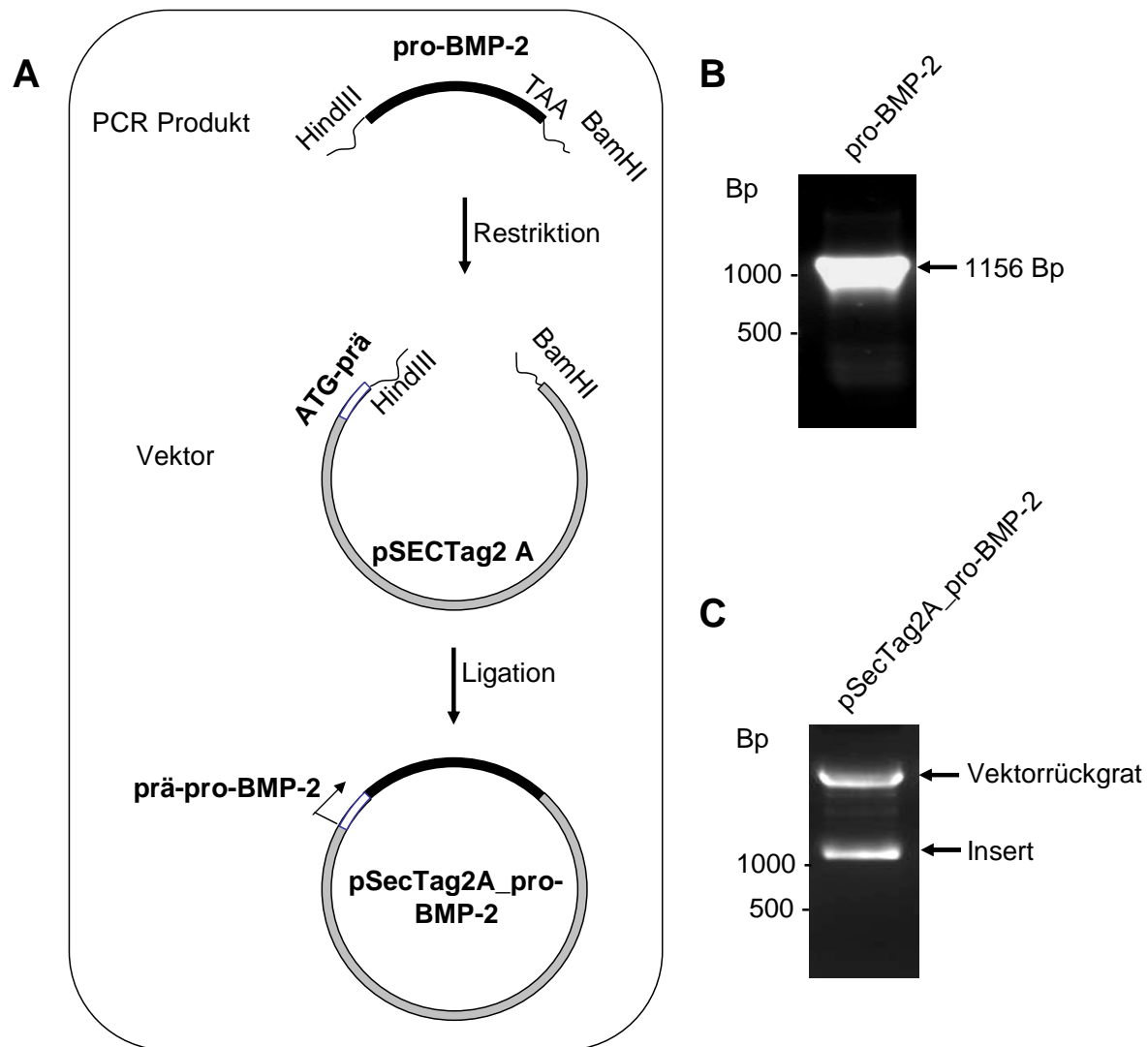


Abb. 27. Klonierung des Plasmids pSecTag2A_pro-BMP-2 für die Expression in Eukaryoten. (A) Klonierungsstrategie. Die pro-BMP-2 Sequenz inklusive Stopcodon (TAA) wurde durch PCR amplifiziert und die angefügten Schnittstellen von *Hind*III und *Bam*HI abgespalten. Der Vektor wurde innerhalb der multiplen Klonierungsseite durch *Hind*III I und *Bam*HI inearisiert und das Insert in richtiger Orientierung des Leserahmens hinein ligiert. Durch den Vektor erhält die pro-BMP-2 Sequenz eine 5'-angefügte Präsequenz, die gleich nach dem Startcodon ATG abgelesen wird. (B) Amplifikation der pro-BMP-2 Sequenz durch PCR. TAE-Agarosegel mit aufgetrennter DNA. Das PCR Produkt soll eine kalkulierte Größe von 1156 Bp haben. (C) Plasmid-DNA Analyse eines transformierten *E.coli* Klon. TAE Agarosegel mit restringierter (*Hind*III und *Bam*HI) Plasmid-DNA. Nachweis der erfolgreichen Ligation von Vektor und Insert durch Herausschneiden des aufgenommenen Inserts (~1100 Bp).

Dieses Konstrukt wurde zur Überprüfung des korrekten Leserahmens sequenziert und erwies sich als fehlerfrei. Zur Proteinexpression wurden die Konstrukte anschließend transient in HEK293 Zellen transfiziert, und nach 24 Stunden Expression die Kulturüberstände mittels Western blot analysiert (Abb. 28 A).

In diesem Expressionssystem war ebenfalls eine sehr geringe Sekretion der Proform in den Kulturüberstand nachweisbar (Abb. 28 A oberer Pfeil). Dies ist ein weiterer Beweis, dass die Proform auch ohne posttranslationale Modifikation (Furin-Spaltung) sekretiert wird. Die Zugabe

von FSAP führte zu einer Spaltung der Proform, sowie des reifen Peptids (Abb. 28 A). Um die Sekretion der Proform in den Überstand zu steigern, wurden die Zellen mit Furininhibitor (FI) behandelt. Nach Behandlung der Zellen mit Furininhibitor war die Proform in ausreichender Menge im Kulturüberstand vorzufinden (Abb. 28 B). Nun konnte nach der endogenen BMP-2 Spaltung auch die Proteolyse der sekretierten Proform nach FSAP Behandlung dokumentiert werden (Abb. 28 B).

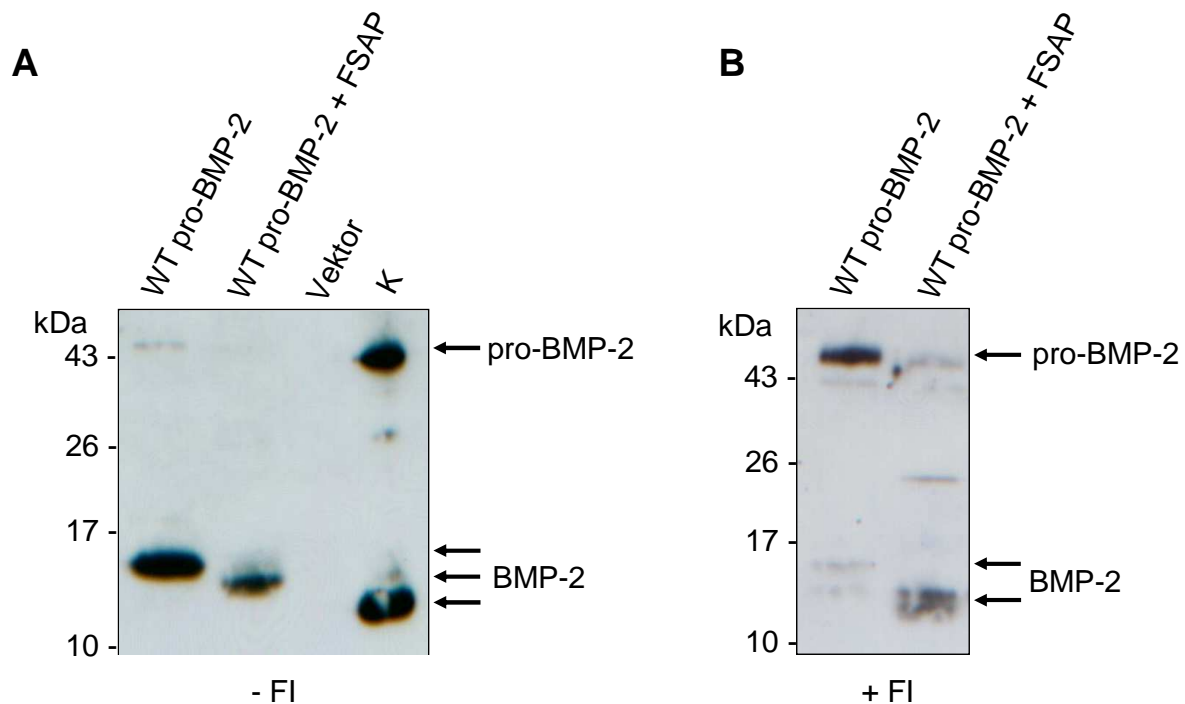


Abb. 28. Sekretion von rekombinantem pro-BMP-2 und Spaltung nach FSAP Behandlung. Western blot Analyse der Kulturüberstände von transfizierten HEK293 Zellen mittels polyklonalen anti-BMP-2 Antikörper. (A) ohne Furininhibitor (FI) Behandlung (B) mit Furininhibitor. Zur Negativkontrolle wurde der leere Vektor transfiziert. WT=Wildtyp pro-BMP-2, K= Kontrollprotein aus *E.coli* Herstellung.

Die Überstände der transfizierten HEK-293 Zellen wurden gesammelt und anschließend die biologische Aktivität durch ALP-Assay in C2C12 Myoblasten überprüft.

Dazu wurden die Überstände mit FSAP oder Puffer vorinkubiert (30 min 37°C) und anschließend C2C12 Zellen stimuliert. Die Analyse der ALP Induktion ergab, dass die rekombinate Proform ohne biologische Aktivität war, jedoch durch FSAP Behandlung aktiviert werden konnte (Abb. 29). Interessanterweise hatte die Zugabe des Furininhibitors keinen Einfluss auf das Ergebnis. Es scheint, als hätte sekretiertes reifes BMP-2 keinen Einfluss auf die ALP Induktion, da hier keine Unterschiede zwischen Leervektor, pro-BMP-2 ohne Furininhibitor und pro-BMP-2 ohne FSAP zu erkennen waren (Abb. 29 A). Zur Kontrolle wurde die FSAP Aktivität in diesen Proben untersucht. Die Zugabe des Furininhibitors hatte keinen inhibierenden Effekt auf die FSAP Aktivität (Abb. 29 B).

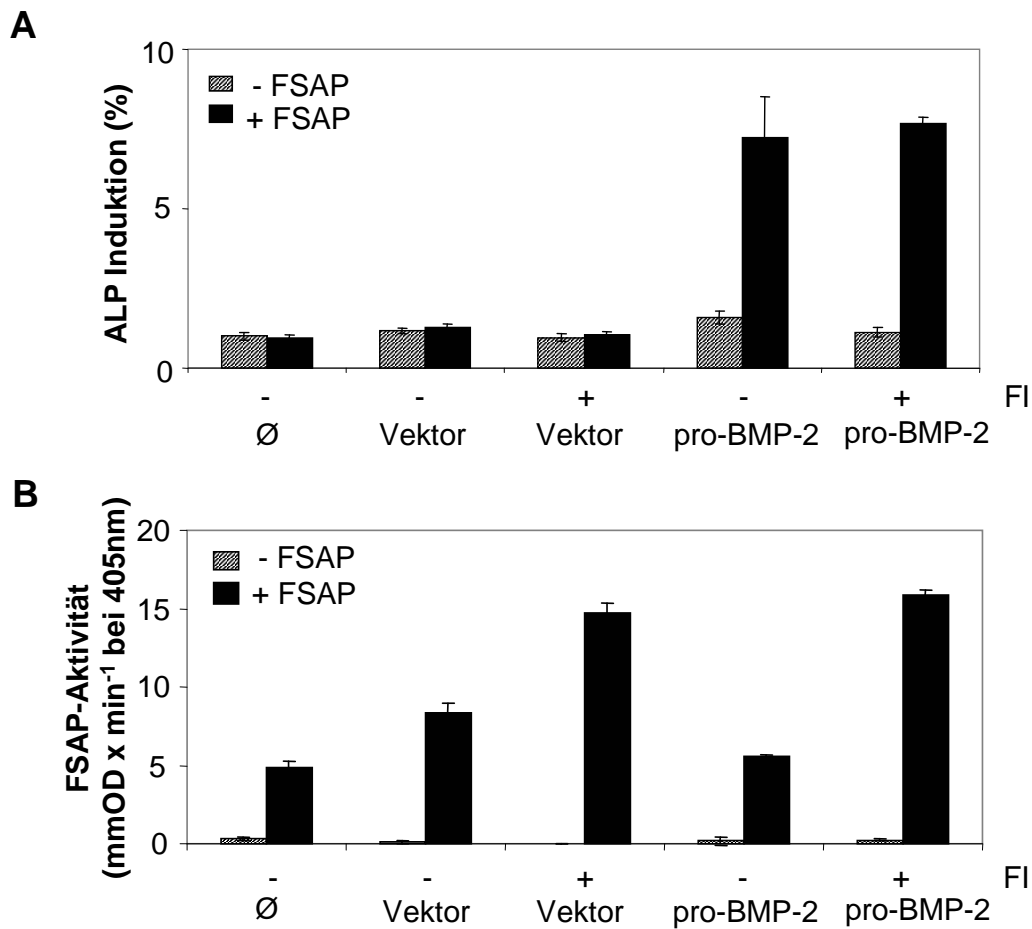


Abb. 29. Sekretiertes pro-BMP-2 wird durch FSAP aktiviert. (A) Bestimmung der Induktion der alkalischen Phosphatase (ALP) nach Stimulierung von C2C12 Zellen mit den Kulturüberständen von pSecTag2A_pro-BMP-2 transfizierter HEK293 Zellen (mit und ohne Furininhibitor Behandlung (FI)). Die Überstände wurden zuvor mit oder ohne FSAP behandelt (30 min 37°C). (B) Bestimmung der FSAP Aktivität. Die Kulturüberstände wurden mit 10 µg/ml FSAP behandelt (30 min 37°C) und die FSAP Aktivität durch Umsetzung des chromogenes Substrats bei 405 nm ermittelt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die inaktive Proform von BMP-2 auch in transfizierten HEK293 sekretiert wird, und dass FSAP endogenes BMP-2 spaltet und aktiviert. Diese Aktivierung ist unabhängig von der Aktivität von endogenem Furin.

Da die Spaltstellen von pro-BMP-2 und BMP-2 bereits identifiziert waren (Kapitel 5.1 und 5.3), sollte durch eine Mutationsstudie ermittelt werden, welche Aminosäuren innerhalb der Spaltstelle essentiell für die FSAP-Spaltung sind.

Da FSAP den Wachstumsfaktor in einer Region mit hoher basischer Aminosäuren Dichte spaltet, war es fraglich, ob durch Mutationen einzelner basischer Aminosäuren zu unpolaren Aminosäuren eine Spaltungsinhibierung auftritt (Abb. 30). Durch Klonierung und Expression diverser pro-BMP-2 Mutanten in eukaryotischen Zellen sollte durch FSAP Behandlung eine Interaktion untersucht werden. Dazu wurden 5 pro-BMP-2 Konstrukte kloniert, bei denen jeweils ein Arginin

zu einen Serin (K278S, R282S, K285S, R282S, K290S) mutiert wurde (Abb. 30).

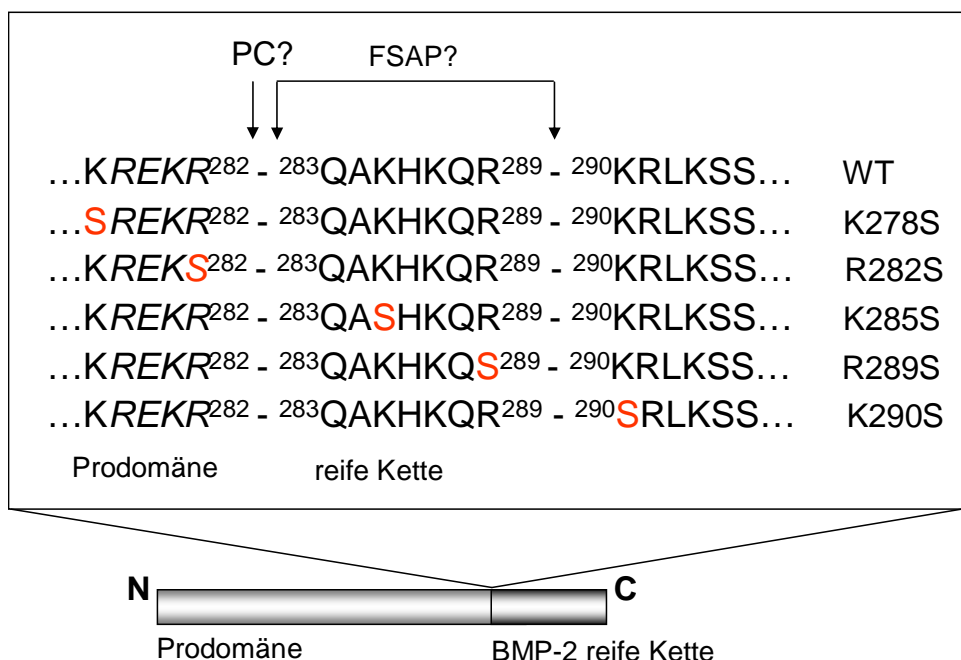


Abb. 30. Schema der Mutationsstudie von pro-BMP-2. Darstellung des Übergangs zwischen Prodomäne und reifer BMP-2 Kette. Die Furinschnittstelle ist kursiv eingezeichnet und soll in der Wildtypform durch Proproteinkonvertasen (PC) prozessiert werden. Die FSAP induzierten Spaltstellen sind durch Pfeile markiert. Für die Struktur-Funktions Analyse werden die Reste K278, R282S, K285S, R282S und K290S (rot) zu unpolaren Serinen mutiert.

Ziel war es, durch die pro-BMP-2 Mutanten die entscheidenden Aminosäuren für die FSAP Spaltung zu identifizieren. Alle Mutanten ließen sich erfolgreich mit ähnlicher Ausbeute (~80 ng/ml Protein) in HEK293 Zellen exprimieren. Der Zellüberstand wurde mit FSAP behandelt (30 min 37°C) und anschließend C2C12 Zellen stimuliert. Überraschenderweise war die Aktivität der verschiedenen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp unverändert (Abb. 31).

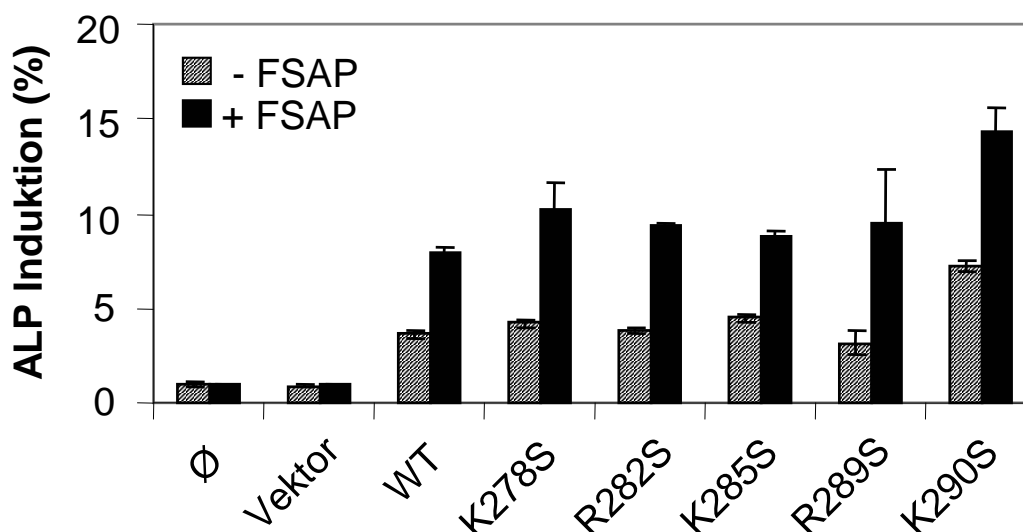


Abb. 31. Aktivitätstest der verschiedenen pro-BMP-2 Mutanten nach FSAP Behandlung. Das konditionierte Medium der transfizierten HEK293 Zellen wurde gesammelt und mit/ohne FSAP behandelt (30 min 37°C). C2C12 Zellen wurden mit den Überständen (50 µl) stimuliert und die Induktion der ALP ermittelt. Daten repräsentieren 1 von 3 unabhängigen Experimenten.

Alle pro-BMP-2 Mutanten zeigten nach FSAP Behandlung eine Aktivitätssteigerung (Abb. 31). Auch auf Proteinebene wurden alle Mutanten durch FSAP proteolytisch in die reife Form gespalten (Abb. 32 A+B).

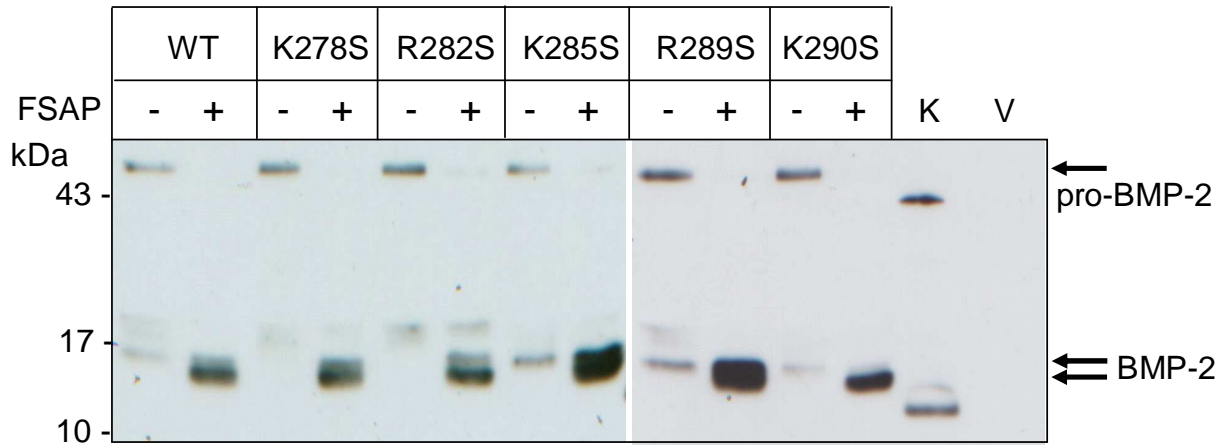


Abb. 32. FSAP spaltet alle pro-BMP-2 Mutanten. Western blot-Analyse der Zellüberstände nach Proteinexpression in HEK293 Zellen mit polyklonalen anti-BMP-2 Antikörper. Das Wildtyp (WT) Protein sowie die pro-BMP-2 Mutanten K278S, R282S, K285S, R282S und K290S wurden mit FSAP inkubiert (60 min 37°C). K=Kontrolle (pro-BMP-2 und BMP-2 aus *E.coli* Herstellung), V=Vektor

Desweiteren sollte geklärt werden, ob zeitabhängige Unterschiede der FSAP induzierten Proteolyse auftreten. Dazu wurden die mutierten pro-BMP-2 zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit FSAP inkubiert und der Western blot-Analyse unterzogen. Jedoch ergaben sich auch hier keine Unterschiede im Spaltungseintritt im Vergleich zum Wildtyp pro-BMP-2 (Abb. 33).

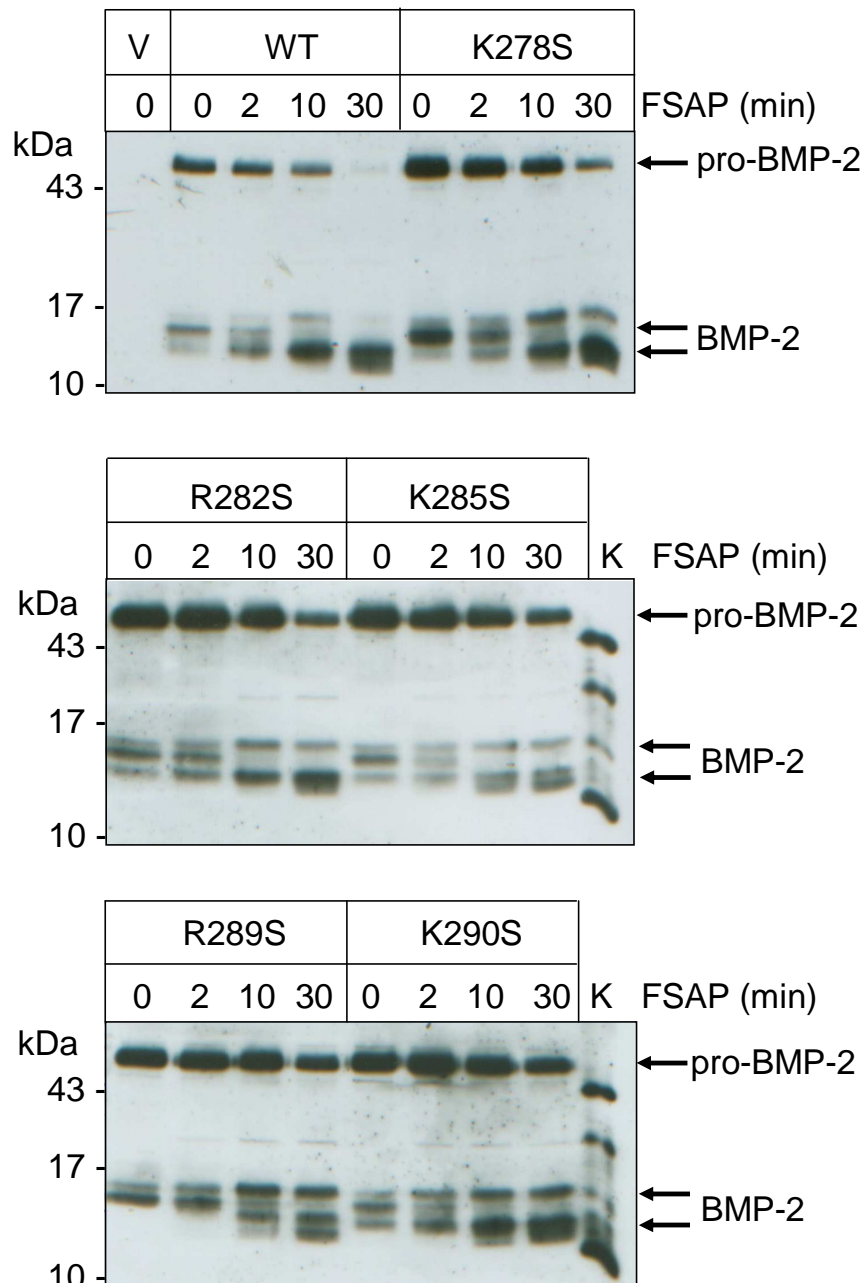


Abb. 33. Zeitabhängige Proteolyse von mutierten pro-BMP-2 durch FSAP. Western blot Analyse der Zellüberstände nach Proteinexpression in HEK293 Zellen mit polyklonalen anti-BMP-2 Antikörper. Das Wildtyp (WT) Protein sowie die pro-BMP-2 Mutanten wurden mit FSAP inkubiert. V=Vektor, K=Kontrolle (pro-BMP-2 und BMP-2 aus *E.coli* Herstellung).

Durch diese pro-BMP-2 Mutationsstudie wurde nachgewiesen, dass der Austausch der basischen Aminosäuren K278S, R282S, K285S und K290S zu unpolaren Serinen nicht essentiell für die Prozessierung durch FSAP oder PC's sind (PC's= Propeptidkonvertasen).

Daraus folgte die Fragestellung, ob die benachbarten Sequenzen der FSAP Spaltstellen mitverantwortlich sind. Um diese Frage zu beantworten, wurden Triple-Mutanten von pro-BMP-2 hergestellt und in HEK293 Zellen exprimiert. Die Herstellung der Triple-Mutanten erfolgte in mehreren Stufen, indem jede einzelne Base innerhalb des Aminosäureaustauschs durch Mutagenese-PCR ersetzt wurde. Dabei entstand das Konstrukt pro-BMP-2_{SSS}²⁸² mit einer

mutierten Furin Spaltstelle, sowie das Konstrukt pro-BMP-2_SSS²⁸⁹ dass eine Triple-Mutation vor der FSAP Spaltstelle der reifen BMP-2 Kette trägt (Abb. 34).

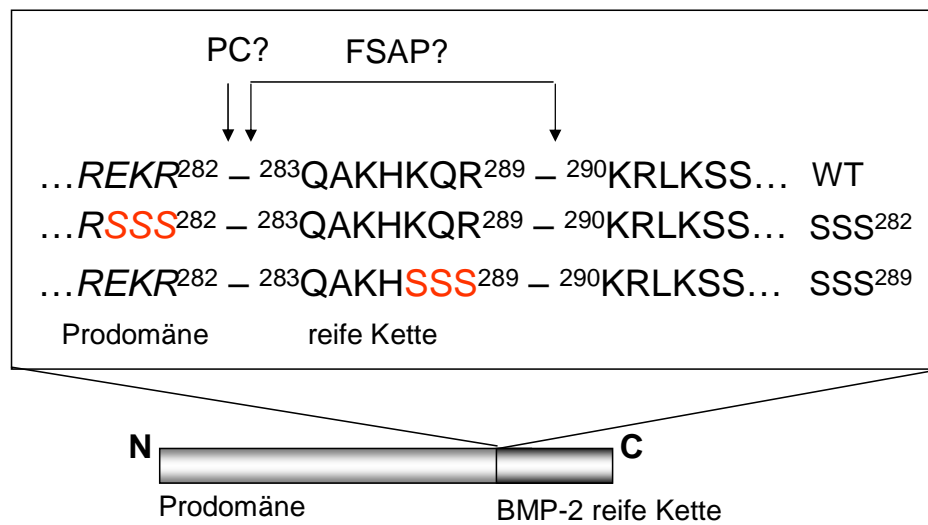


Abb. 34. Schema der Triple-Mutationsstudie von pro-BMP-2. Darstellung des Übergangs zwischen Prodomäne und reifer BMP-2 Kette. Die Furinschnittstelle ist kursiv eingezeichnet. Die putativen FSAP Spaltstellen sind durch Pfeile markiert. Für die Triple Mutation werden die Reste EKR²⁸² zu SSS²⁸² sowie KQR²⁸⁹ zu SSS²⁸⁹ mutiert (rot). Durch den 3-fachen Aminosäureaustausch zu unpolaren Serinen soll die Proteolyse der Varianten pro-BMP-2_SSS²⁸² sowie pro-BMP-2_SSS²⁸⁹ durch FSAP analysiert werden. WT= Wildtyp, PC=Proproteinkonvertase

Die Triple-Mutanten wurden in Anwesenheit/Abwesenheit von Furininhibitor in HEK293 Zellen exprimiert, und nach 24 h geerntet. Es war fraglich, ob die Mutation der Furinspaltstelle Auswirkung auf die Proteinqualität bzw. die Sekretion haben könnte. Um dies genauer zu analysieren, wurden die Überstände und Zellextrakte der Triple-Mutanten untersucht.

Bei der Western blot Analyse stellte sich heraus, dass die Triple-Mutante SSS²⁸² kaum in den Überstand sekretiert wird (Abb. 35 A). Bei der Triple-Mutante SSS²⁸⁹ entstand ein weiteres Fragment mit einem Molekulargewicht von ~20 kDa (Abb. 35 A). Zur Kontrolle dienten die Einzelmutationen K258S, K290S sowie der Leervektor.

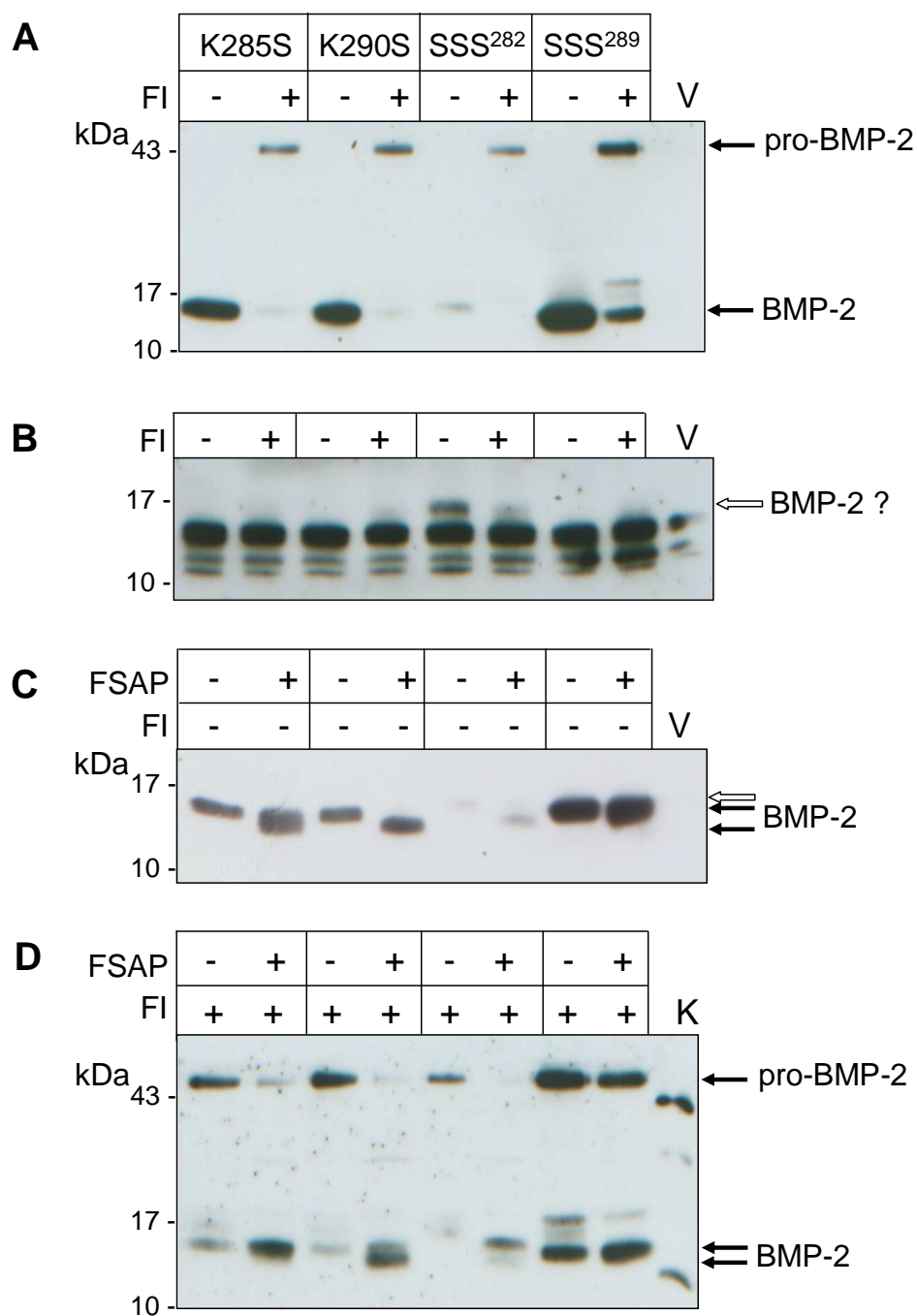


Abb. 35. Analyse der Sekretion und Prozessierung der pro-BMP-2 Triple-Mutanten. Western Blot-Analyse der Kulturüberstände sowie der Zellextrakte von transfizierten HEK293 Zellen (Einzelmutationen K285S und K290S sowie der Triple-Mutanten SSS²⁸² und SSS²⁸⁹, als Kontrolle dient der Leervektor (V)) mit polyklonalen anti-BMP-2 Antikörper. (A) Analyse der Kulturüberstände mit bzw. ohne Furininhibitor (FI) Behandlung und (B) Zellextrakte. Analyse der FSAP induzierten Mutanten Prozessierung in Abwesenheit (C) und Anwesenheit (D) von Furininhibitor. K=Kontrolle (pro-BMP-2 und BMP-2 aus *E.coli* Herstellung).

Die Analyse der Zellextrakte deutet darauf hin, dass die Triple-Mutante der Furinspaltstelle (SSS²⁸²) bereits intrazellulär abgebaut wird. Hier akkumulierte eine Proteinbande im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 35 B, weißer Pfeil). Bei Zugabe von FSAP zu dem konditionierten Medium wurde jedoch deutlich, dass FSAP die Prodomän Triple-Mutante weiterhin spalten konnte Dies

ließ sich nach Furininhibitor Behandlung beobachten, in dem durch FSAP die Bande des Proproteins durch das Erscheinen des kleinen Peptids (gekennzeichnet durch Pfeile) ersetzt wurde (Abb. 35 D). Bei der Triple-Mutante SSS²⁸⁹ der reifen Kette ist erkennbar, dass FSAP diese nicht mehr prozessieren konnte (Abb. 35 C, D).

Nach Stimulierung der Überstände mit FSAP wurde die pro-BMP-2 Prozessierung mittels Aktivitätstest in C2C12 Myoblasten untersucht (Abb. 36). Dabei stellte sich heraus, dass es bei der SSS²⁸² Triple-Mutante durch FSAP nur zu minimalen Effekten kam, bei der Triple-Mutante SSS²⁸⁹ zu keinerlei Aktivitätssteigerung (Abb. 36).

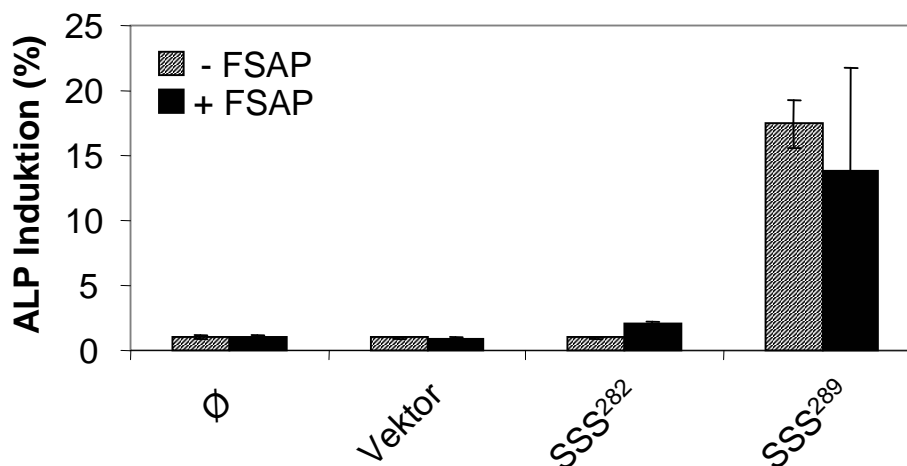


Abb. 36. Die Triple-Mutation SSS²⁸⁹ innerhalb der reifen BMP-2 Kette schützt vor der FSAP Aktivierung. C2C12 Myoblasten wurden mit dem Überstand (50 μ l) von transfizierten HEK293 Zellen stimuliert und die Induktion der alkalischen Phosphatase bestimmt. Die Überstände wurden zuvor mit FSAP oder Puffer inkubiert (30 min 37°C). Daten repräsentieren 1 von 2 unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass diese Triple Mutationsstudie den Befund hervor brachte, dass die Sequenz der Furinspaltstelle REKR²⁸² essentiell für die Proteinqualität ist, und die Sekretion reguliert. Ohne Furininhibitor wird nur sehr wenig reifes BMP-2 sekretiert im Vergleich zu den anderen pro-BMP-2 Varianten (Abb. 35 A). Bei genauerer Betrachtung könnte es zu der Annahme kommen, dass das sekretierte reife SSS²⁸² ein etwas größeres Molekulargewicht (weißer Pfeil) hat im Vergleich zu den anderen reifen Peptiden (Abb. 35 A, C). Nach Furininhibitorzugabe wird die Proform sekretiert, allerdings auch hier deutlich schwächer (Abb. 35 A).

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, dass die Triple-Mutante der Prodomäne weiterhin von FSAP prozessiert werden kann, jedoch nicht die Triple-Mutante der reifen BMP-2 Kette.

5.11 Pro-GDF-5 wird aktiviert durch FSAP

GDF-5 zeigt 53% Homologie zu BMP-2, daher sollte untersucht werden ob FSAP auch humanes pro-GDF-5 aktivieren kann (uniprot.org Eintrag P43026; Homologievergleich durch Softwareprogramm ClustalW).

Der Einfluss der FSAP auf die biologische Aktivität von pro-GDF-5 (1 nM=52 ng/ml) wurde mittels ALP-Assay bestimmt. Wie bei pro-BMP-2 konnte hier eine FSAP abhängige Aktivierung der latenten Proform erfasst werden (Abb. 37).

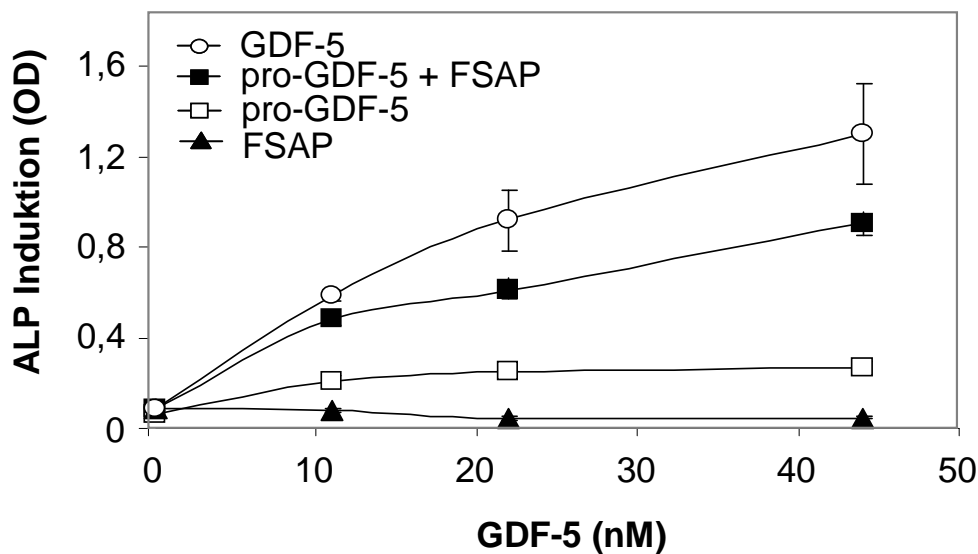


Abb. 37. Pro-GDF-5 wird aktiviert durch FSAP. Induktion der alkalischen Phosphatase (ALP) nach Inkubation mit pro-GDF-5 in Anwesenheit/Abwesenheit von FSAP bzw. GDF-5 allein in murinen stromalen MCHT1/26 Zellen.

Zur Bestimmung der FSAP vermittelten Proteolyse wurde pro-GDF-5 konzentrations- und zeitabhängig mit FSAP inkubiert und die Prozessierung mittels Western blot-Analyse untersucht. Pro-GDF-5 (oberer Pfeil) Spaltung in seine reife Form (unterer Pfeil) wurde in Abhängigkeit von FSAP Konzentration, proteolytischer Inhibierung durch Aprotinin und in Abhängigkeit von der Inkubationszeit demonstriert (Abb. 38 A+B). Als Kontrollgröße des korrekten Spaltproduktes wurde reifes GDF-5 eingesetzt.

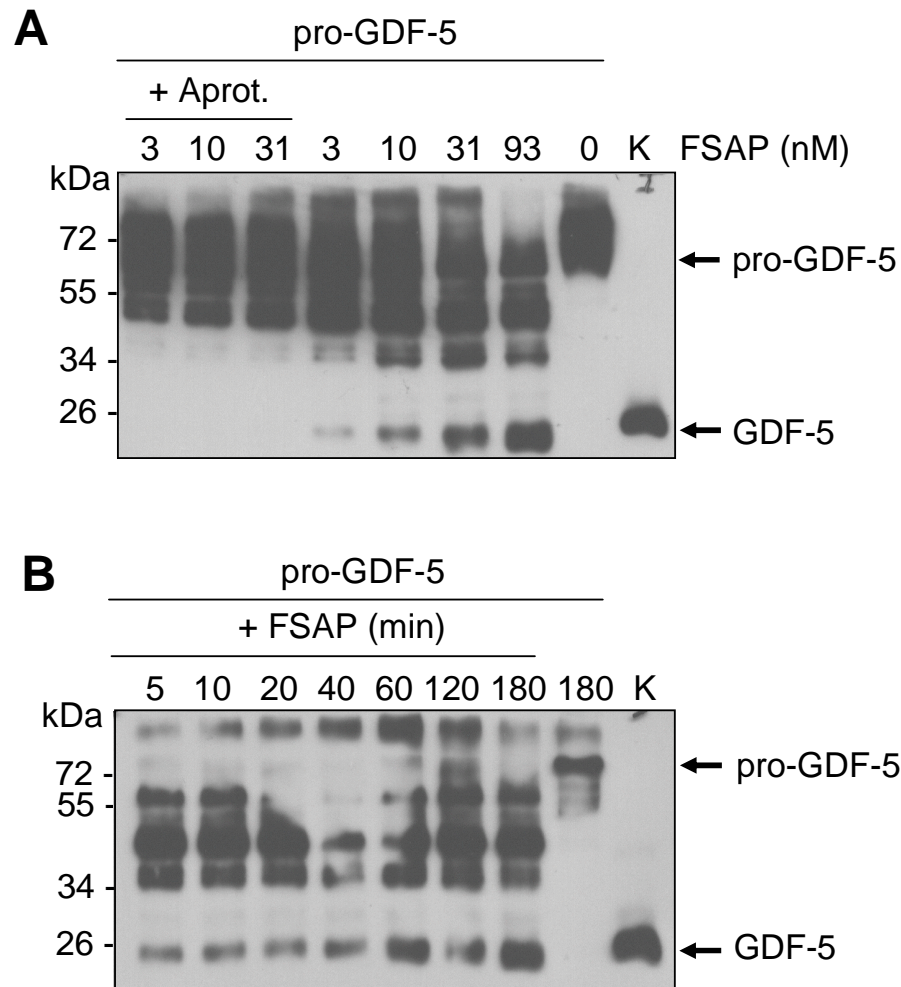


Abb. 38. Konzentrations- und zeitabhängige Proteolyse von pro-GDF-5 durch FSAP. (A) Western blot-Analyse mit anti-GDF-5 Antikörper. Pro-GDF-5 (6 µg/ml) wurde konzentrationsabhängig mit FSAP (3-93 nM) in Anwesenheit/ Abwesenheit von Aprotinin inkubiert (2 h 37°C). Als Kontrollgröße dient reifes GDF-5 (unterer Pfeil). FSAP spaltet das große Proprotein (130 kDa, oberer Pfeil) in sein reifes Peptid (24 kDa, unterer Pfeil). Enzymatisch inhibiertes FSAP führt zu keiner Spaltung. (B) Zeitabhängige Spaltung von pro-GDF-5 durch FSAP (5-180 min). Western blot-Analyse mit anti-GDF-5 Antikörper. Das kleinere Spaltprodukt (< 24 kDa, unterer Pfeil) entstand bereits nach 5-minütiger FSAP Inkubation. Als Kontrollfragment (K) dient reifes GDF-5.

FSAP aktiviert damit gleich zwei Unterfamilien aus der TGF- β Superfamilie, nämlich die BMPs (BMP-2) und GDFs (GDF-5).

5.12 FSAP hat keinen Effekt auf die TGF- β -1 Funktion

TGF- β -1 ist ein sehr wirkungsvolles Zytokin, dessen erhöhte Aktivität zu einer morphologischen Veränderungen der vaskulären Zielzellen, beispielsweise Matrix-Akkumulation bei Arteriosklerose (David et al., 2009; Bobik 2006) führt. Daher bietet sich die FSAP/TGF- β -1 Protein-Interaktionsstudie im Zusammenhang mit vaskulären Remodellierungsvorgängen an (Kapitel 3).

Um einen möglichen biologischen Effekt der FSAP auf reifes TGF- β -1 sowie seiner latenten Proform zu untersuchen, wurde die Proliferation von stimulierten Zellen (MLEC) analysiert. Die Koinkubation mit FSAP und den Wachstumsfaktoren erwies sich jedoch ohne Effekte auf die DNA-Synthese der Zellen (Abb. 39).

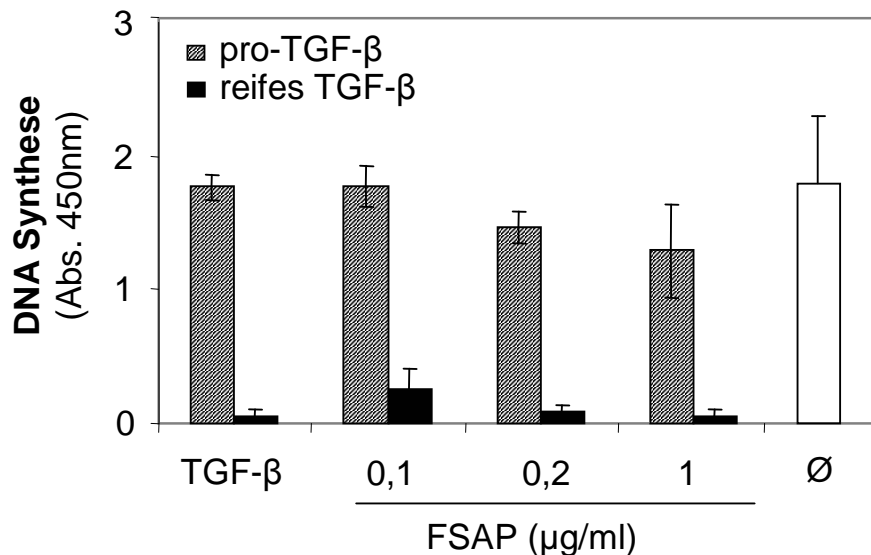


Abb. 39. FSAP hat keinen Einfluss auf die biologische Aktivität von TGF- β -1. DNA-Synthese Bestimmung durch BrdU-Einbau ELISA. TGF-1 (25 μ g/ml) und pro-TGF- β -1 (25 μ g/ml) wurden mit verschiedenen Konzentrationen von FSAP in Anwesenheit von Heparin wurden inkubiert, und der BrdU DNA-Einbau durch ELISA analysiert.

Um eine mögliche Prozessierung auf Proteinebene zu detektieren, wurde SDS-PAGE angewandt. Nach 60-minütiger Inkubation von TGF- β -1 (5 μ g) mit Plasma FSAP (2 μ g) wurde durch SDS-Gelelektrophorese sichtbar, dass FSAP keinen Effekt auf die TGF- β -1 Prozessierung hat (Abb. 40).

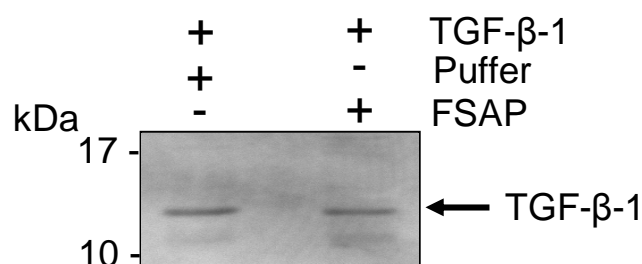


Abb. 40. FSAP hat keinen Einfluss auf TGF- β -1 Prozessierung. SDS-PAGE mit FSAP (2 μ g) inkubierten TGF- β -1 (5 μ g) (2 h bei 37°C). Proteintransfer auf PVDF-Membran und Färbung durch Coomassie. Es erfolgt keine TGF- β -1 Spaltung durch FSAP.

6 Diskussion

Die patientenbezogene Bruneck-Studie von 2003 identifizierte den SNP „Marburg I“ der FSAP als Risikofaktor der koronaren Stenose und Arteriosklerose. Diese Befunde knüpfen an die bisherigen Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe an, indem FSAP *in vivo* als protektiver Faktor der Atherogenese beschrieben wurde, da FSAP das pro-proliferative Cystein-Knoten Protein PDGF-BB durch Proteolyse inhibierte. Daraus folgte die Fragestellung, ob FSAP auch weitere beteiligte Cystein-Knoten Proteine der vaskulären Remodellierungsvorgänge reguliert.

6.1. FSAP Wechselwirkung mit reifen BMP-2 und TGF- β -1

Während der Remodellierungsvorgänge der Atherogenese und vaskulären Kalzifizierung sind diverse Cystein-Knoten Proteine beteiligt. PDGF-BB kontrolliert Proliferation und Migration der VSMCs, während die TGF- β Superfamilienmitglieder TGF- β -1 und BMP-2 vor allem für die Differenzierung ihrer Zielzellen sorgen (Kapitel 1.1, 1.2 und 1.4.3).

Durch eine Interaktionsstudie von FSAP mit dem aktiven Dimer PDGF-BB stellte sich heraus, dass FSAP das dimere Protein an zwei Stellen spaltet: innerhalb der natürlich vorkommenden Spaltstellen durch Plättchensekretion bei Position R¹¹³-T¹¹⁴ sowie in der *loop*-III Region innerhalb des PDGFR Bindemotifs R¹⁶⁰-K¹⁶¹ sowie K¹⁶¹-K¹⁶² (Schilling et al., 1998, uniprot.org Eintrag P01127). Die Proteolyse führte zu einer Inhibierung der biologischen Aktivität (Shibamya et al., 2007). Daher war das Interesse hoch, auch eine Wechselwirkung mit den Cystein-Knoten Proteinen BMP-2 und TGF- β -1 zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von FSAP mit reifen BMP-2 untersucht und ebenfalls eine Proteolyse des aktiven Cystein-Knoten Proteins identifiziert. Auch hier erwies sich FSAP zu basischen Aminosäureresten affin, indem es BMP-2 zeit- und konzentrationsabhängig bei Position R²⁸⁹-K²⁹⁰ spaltete. Die Proteolyse hatte jedoch im Gegensatz zu PDGF-BB keine Inhibierung, sondern eine Verstärkung der biologischen Aktivität zu Folge. Dies erweitert die bisherigen Erkenntnisse, dass FSAP durch Proteolyse die Wachstumsfaktoren nicht nur inhibiert, sondern auch deren Aktivität verstärken kann.

Erstaunlicherweise erwies sich die Inkubation von FSAP mit TGF- β -1 als wirkungslos. Verfolgt man das Muster der FSAP Spaltung innerhalb Ansammlungen von basischer Aminosäuren, würde man beispielsweise eine Proteolyse von TGF- β -1 bei Position R³⁰³-K³⁰⁴ oder R³⁷¹-K³⁷² (uniprot.org Eintrag P01137) erwarten. Da dies jedoch nicht der Fall war, lässt

es darauf schließen, das für die Interaktion mit FSAP wahrscheinlich nicht die gemeinsamen Strukturelemente der Cystein-Knoten Proteine verantwortlich sind (Kapitel 1.3.5 PDGF-BB und VEGF), sondern spezifische Erkennungssequenzen innerhalb der Aminosäuresequenz.

Vorherige Untersuchungen zur Interaktion von FSAP mit PDGF-BB ergaben leider keine Erkenntnisse über das Bindeepitop der FSAP an PDGF-BB. Da jedoch eine Wechselwirkung mit homologen PDGF-AA (60 % Homologie, ClustalW.org) ausblieb (unpublizierte Beobachtung Lars Muhl), scheint die Lokalisation der putativen kationischen Spaltstelle nicht ausreichend für die Erkennung durch FSAP sein. Daher könnten die flankierenden Nachbarsequenzen wichtig für die Erkennung der FSAP sein. Dies wäre auch eine mögliche Erklärung, warum TGF- β -1 nicht durch FSAP prozessiert wurde, bzw. warum PDGF-BB (uniprot.org Eintrag P01127) nicht wie BMP-2 (bei Arginin-Lysin Folge) bei Position R¹⁵⁵-K¹⁵⁶ gespalten wird. Eine weitere Erklärung könnte die strukturelle Besonderheit von TGF- β -1 sein, Komplexe mit kleinen Peptiden zu bilden (Kapitel 1.4.2). Dies wirft die Frage auf, ob durch die Komplexbildung die Konformation verändert ist und FSAP keinen Zugang zu dem Erkennungsmotif hat. Durch die Komplexbildung könnte andererseits auch die Erkennungssequenz verdeckt sein. In diesem Fall nehme TGF- β -1 eine einmalige Stellung ein, indem seine Komplexbildung protektiv vor der FSAP Proteolyse wirken könnte. Um diese Beobachtung genauer zu analysieren, könnte durch eine Strukturanalyse ein vergleichendes Konformationsmodell diverser Cystein-Knoten Proteine durchgeführt werden. Hier müsste der Fokus auf die nach außen exponierten Strukturelemente gelegt werden, an die FSAP stöchiometrischen Zugang hätte.

Nachdem nun BMP-2 als neuer Interaktionspartner von FSAP identifiziert wurde, war fraglich welche Auswirkung die Proteolyse auf die biologische Aktivität hatte. Da die BMP-Signalkaskade durch Analyse der Smad1/5/8 Phosphorylierung gesteigert war, wurde die Frage aufgeworfen, ob prozessiertes BMP-2 stärkere Affinität zu seinen Rezeptoren aufweist. Bei Betrachtung der BMP-2 Spaltstelle wird jedoch klar, dass diese Sequenz nicht mit den Rezeptoren interagiert (Kirsch et al., 2000). BMP-2 verfügt über eine zentrale α -Helix und zwei umliegende *loop*-Regionen. Diese „Finger“ werden durch antiparallele β -Faltblattstrukturen gebildet, die zentrale Helix ist vierfach gedreht. Insgesamt sind 10 β -Faltblätter vorzufinden, der Finger 1 beinhaltet β 1- β 5a und Finger 2 β 6- β 9. Wie in Abb. 41 dargestellt, sind zur Bindung an BMPRIA die in Finger 1 befindlichen Reste D³⁰, W³¹, A⁵² und S⁶⁹ wichtig, zur Bindung an ActRII ist A³⁴ relevant, sowie die in Finger 2 gelegenen Aminosäuren L⁹⁰, L¹⁰⁰ und S⁸⁸ (Kirsch et al., 2000). Demnach scheint der durch FSAP prozessierte N-Terminus an der Rezeptorbindung unbeteiligt zu sein (Abb. 41). Da das erste

Cystein durch die FSAP Spaltung noch N-terminal erhalten bleibt (Abb. 41; Position C¹⁴), hat die FSAP Proteolyse auch keinen Einfluss auf die Disulfidbrücken von BMP-2, und somit auf die Stabilität des Cystein-Knotens.

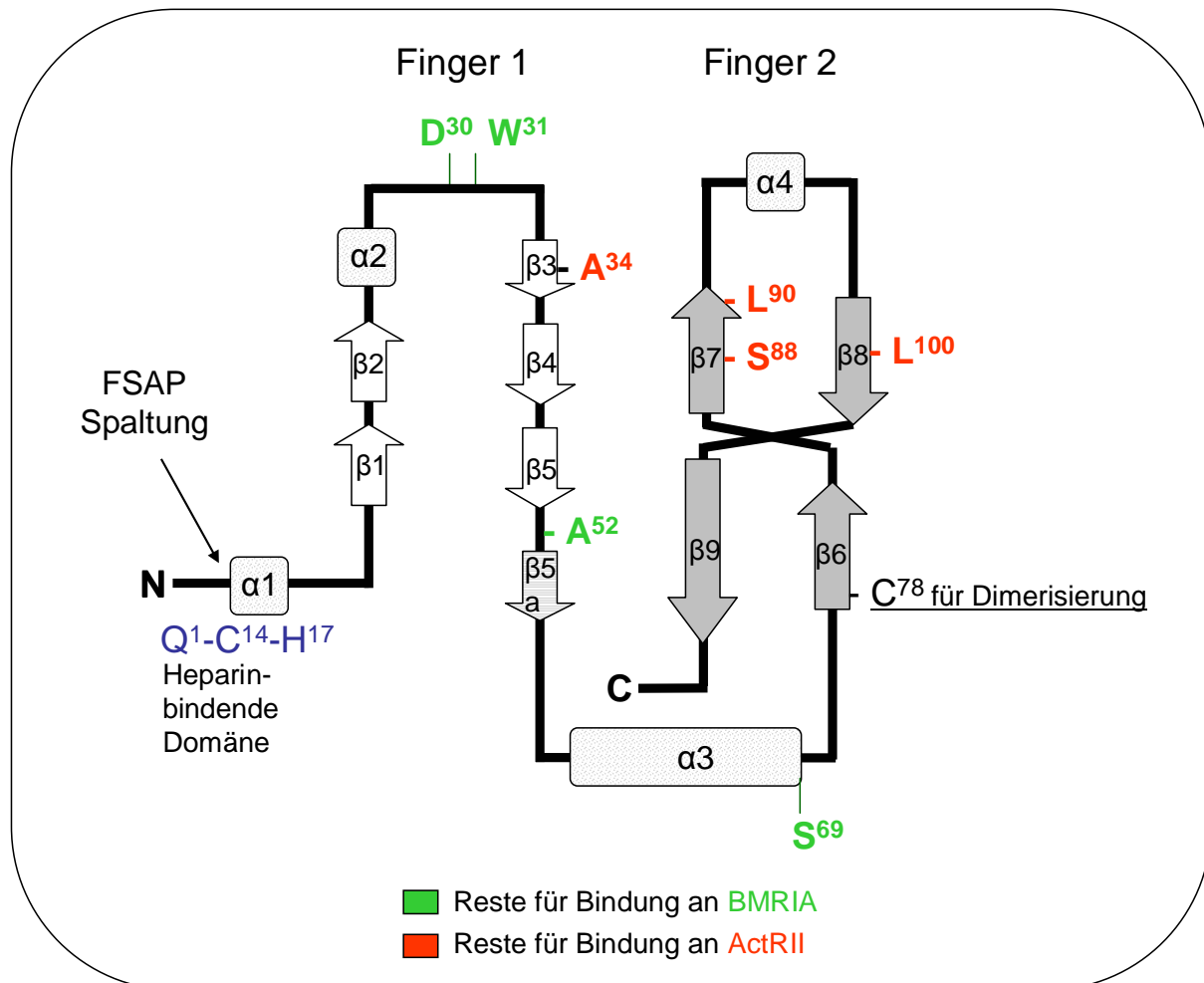


Abb. 41. Schematische Darstellung der BMP-2 Sekundärstruktur. Eingezeichnet sind die 10 β-Faltblätter und 4 α-Helices. β-Faltblätter des 1. Fingers sind weiß unterlegt, die des 2. Fingers in grau. Die α-Helix3 ist vierfach gedreht und an zentraler Position. Die verantwortlichen Aminosäuren zur Bindung an BMPRIA sind grün dargestellt, Bindung an ActRII wird durch rot dargestellte Reste induziert. Cystein⁷⁸ ist essentiell zur BMP-2 Dimer-Bildung. Der N-Terminus ist frei beweglich und stellt von Q¹-H¹⁷ die heparinbindende Domäne dar, das erste Cystein ist in Position C¹⁴. Die FSAP-induzierte Spaltung erfolgt am N-Terminus innerhalb der heparinbindenden Domäne. Numerische Aminosäureangaben beziehen sich auch das reife Peptid. Modifiziert nach Scheufler et al., 1999.

Wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben, ist die extrazelluläre Gradientenformation der BMPs wichtig für die Initiation der Signalübermittlung. Dabei interagiert die heparinbindende Domäne mit sulfatierten Proteoglykanen der extrazellulären Matrix (Ruppert et al., 1996). Die heparinbindende Domäne ist an der N-terminalen Region der reifen BMP Peptidkette lokalisiert (Ruppert et al., 1996) (Abb. 41). Bei diesem Motiv handelt es sich um konservierte

Sequenzen, die beispielsweise auch bei den PDGFs vorzufinden sind. Hier befindet sich die so genannte „Retentionssequenz“ jedoch am C-Terminus der reifen Kette (Fredriksson and Eriksson 2004). Die Abspaltung dieser Domäne (Aminosäure 190-241) bewirkt eine Aufhebung der Matrixbindung (Lindblom et al., 2003).

Durch die FSAP bedingte Spaltung kommt es bei BMP-2 zum Bruch der heparinbindenden Domäne. Durch das Fehlen dieser stark basischen Aminosäuresequenz könnte die Anheftung an die Matrix stark reduziert sein. Demnach würde prozessiertes BMP-2 in freier Diffusion vorliegen, und hätte somit direkten Zugang zum Rezeptor.

Um diese These zu überprüfen, könnte in der Praxis der Einfluss von FSAP auf die biologische Verfügbarkeit und Rezeptorbindung von BMP-2 ermittelt werden.

Zum einen könnte die freie Diffusion von BMP-2 durch Behandlung der Zellen mit Heparinase (Jiao et al., 2007) begünstigt werden, zum anderen eine direkte Rezeptorbindung mit radioaktiv markierten BMP-2 gemessen werden. Der Vergleich zwischen FSAP und Puffer behandelten BMP-2 könnte Aufschluss auf die Bindeaffinitäten zur Matrix und BMPR ergeben. Leider konnten diese Experimente durch fehlende Möglichkeiten nicht in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt werden.

Vorherige Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe identifizierten Heparin als Kofaktor der FSAP (Kapitel 1.3.2). Kannemeier et al., 2004 postulierte in seiner Forschungsarbeit einen verstärkenden Effekt der PDGF-BB Spaltung durch FSAP in Anwesenheit von Heparin.

In der vorliegenden Arbeit sorgte interessanterweise die Kobehandlung von Heparin und FSAP, bzw. Heparin alleine für eine Inhibierung der BMP-Signalkaskade in stimulierten C2C12 Myoblasten sowie VSMCs. Demnach trifft der verstärkende Kofaktoreffekt von Heparin nicht im BMP-2 *in vitro* System zu. Diese Befunde könnten die neueste Publikation von Kanzaki et al., 2011 unterstützen. Die Autoren stellen hier einen zeitabhängigen, dualen Wirkungsmechanismus von Heparin vor. Kanzaki et al. 2011 konnten in der Osteoblasten Zelllinie MC3T3-E1 eine Reduktion der BMP-2 vermittelten ALP Induktion in Anwesenheit von Heparin nach 72 h feststellen. Nach einer Stimulationsdauer von 144 h kam es jedoch zu einer verstärkten ALP Induktion. Für den Mechanismus wurde die Heparin-induzierte Herunterregulierung der BMP Inhibitoren Noggin und Follistatin verantwortlich gemacht, sowie eine Inhibierung von Smad6 und Smad7. In der Kurzzeit Stimulation (12 h) waren außerdem Runx2 und Osterix herunterreguliert. Interessanterweise ergänzen diese Befunde die Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit, da auch Kanzaki et al. (2011) eine zeitabhängige Reduktion der BMP-2 vermittelten Smad1/5/8 Phosphorylierung durch Heparin beobachtete haben. Durch die Heparin-Bindung an BMP-2 und BMPR scheint es durch einen

bisher unbekannten Mechanismus zu einer zeitabhängigen Inhibierung diverser löslicher BMP-Inhibitoren zu kommen, und somit die osteogene Differenzierung anzutreiben (Kanzaki et al., 2008; Kanzaki et al., 2011).

Um die Spezifität der FSAP während der BMP-2 Proteolyse zu ermitteln, wurde eine Vergleichsstudie mit diversen extrazellulären Proteasen durchgeführt. Hier erwies sich aktiviertes Plasminogen als BMP-2 Aktivator. Im Gegensatz zu FSAP vermag Plasmin ebenfalls TGF- β -1 zu aktivieren (George et al., 2006). Obwohl Plasmin und FSAP einige strukturelle Homologien aufweisen, wie EGF- und Kringledomänen, unterscheiden sie sich in ihrer Substratauswahl. Vereint ist neben der BMP-2 Aktivierung lediglich die uPA Aktivierung (Römisch et al., 1999). Es ist außerdem zu bemerken, dass Plasmin ein anderes BMP-2 Produkt (K^{290} - R^{291}) generiert als FSAP (R^{289} - K^{290}). Daher scheint Plasmin, im Vergleich zu FSAP, andere Sequenzmotive seiner Substrate zu erkennen. Durch eine vergleichende Plasmin Substrat Analyse mit Hilfe von synthetischen Peptiden stellte sich heraus, dass Plasmin bei P1 die Aminosäure Arginin benötigt, bei P4 jedoch Lysin (Backes et al., 2000). Dies ist nicht deckungsgleich mit der Spaltstelle der Proteinkonvertasen (P4 und P1 Arginin; Abb. 6). Der gewonnene Befund, dass FSAP kein TGF- β -1 Interaktionspartner ist, ist deshalb nicht ungewöhnlich.

BMPs fördern die Gewebereparatur und Regenerierung, aus diesen Gründen wird an exogen applizierten BMP-2 zu Reparaturförderung geforscht. Da die Halbwertszeit des applizierten Wachstumsfaktors kurz ist, und auch die Diffusionseigenschaften des löslichen Faktors seine biologische Eigenschaft beeinträchtigen, ist die Kontrolle der Aktivität sehr wichtig (Kuwahara et al., 2011). Neben der Verabreichung von immobilisierten BMP-2 (Kuwahara et al., 2011) könnte nun durch FSAP eine gerichtete Proteolyse des Wachstumsfaktors und damit eine Steigerung seiner Aktivität erzielt werden.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten erweitern die Erkenntnisse, dass FSAP durch Interaktion mit Wachstumsfaktoren deren Aktivität regulieren, und somit Einfluss auf fibroproliferativen und degenerativen vaskulären Gefäßerkrankungen ausüben kann.

6.2. FSAP aktiviert die latenten Proproteine pro-BMP-2 und pro-GDF-5

Eine Besonderheit der Cystein-Knoten Proteine ist deren Synthese als inaktive Präproproteine. Wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben, werden der Prodomäne multiple Funktionen zu Teil. Die Regulation, dass heißt die Abspaltung der Prodomäne, zur Erlangung eines bioaktiven Wachstumsfaktors lässt noch viele Fragen offen.

Die latenten Proformen von PDGF-A und -B werden bereits im endoplasmatischen Retikulum prozessiert (RGRR⁸¹), vermutlich durch Familienmitglieder der Furinfamilie, dessen Proteolyse bereits für PDGF-AA aufgeklärt wurde (RRKR⁸⁶) (Fredrikson et al., 2004). Lediglich PDGF-C und -D werden als Proform sekretiert und von uPA, tPA oder Matriptase aktiviert (Hurst et al., 2012). Da PDGF-C und -D nicht zu den FSAP Substrate gehören, wurde der Fokus auf die Prozessierung der TGF- β Superfamilienmitglieder gelegt.

Es stellte sich die Frage, ob FSAP neben der Proteolyse des reifen TGF- β Superfamilienmitglieds BMP-2 auch die latente Proform spalten und aktivieren kann. Dieser Aufgabenstellung geht die Annahme voraus, dass die unreifen Proproteine in den Extrazellulärraum sekretiert werden (Lories et al., 2003; Harrison et al., 2011).

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sind von großem wissenschaftlichen Interesse, da die proteolytische Regulation der TGF- β Superfamilien Proproteinen bisher kaum erforscht ist, und sich durch diese Aktivierung neue klinische Therapieansätze entwickeln lassen könnten.

Die Spaltung von pro-BMP-2 durch FSAP erfolgte bei Position Q²⁸³ und K²⁹⁰. Dabei spaltet FSAP die Prodomäne exakt innerhalb der Furin Erkennungssequenz RXXR von der reifen Kette ab (Abb. 6, 18). Eine weitere Spaltung erfolgt am N-Terminus der reifen Kette innerhalb der heparinbindenden Domäne, wie es zuvor beschrieben wurde (Kapitel 6.1). Die biologische Aktivität war wie bei den Untersuchungen zu reifen BMP-2 in drei Zelltypen initiiert.

Diese Befunde ergänzen die Beobachtungen von Hillger et al., 2005. Hier wurde die pro-BMP-2 Regulation *in vitro* analysiert. Durch Proteolyse mit Trypsin wurden verschiedene N-terminal prozessierte pro-BMP-2 Peptide (drBMP-2=*digit removed*, ohne N-terminale heparinbindende Stelle, Hillger et al., 2005) generiert. Im Verhältnis von 2:1:3 erfolgte die Spaltung bei Position Q²⁸⁹-R²⁹⁰, R²⁹⁰-K²⁹¹ sowie K²⁹¹-R²⁹².

Beim Vergleich der biologischen Aktivität von pro-BMP-2 und drBMP-2 in einem *in vivo* Rattenmodell der ektopischen Knochenbildung erwiesen sich keine signifikanten Unterschiede (Hillger et al., 2005). Heute kann ausgeschlossen werden, dass die Prodomäne durch kovalente Disulfidbrückenbindung ähnlich wie bei dem TGF- β -LAP Komplex inhibitorisch wirkt, sondern dass die Proform durch die zirkulierende Protease FSAP gespalten werden könnte, und somit aktiviert wird. Die Applikation von pro-BMP-2 und drBMP-2 mittels Implantate in dem abdominalen Beutel von Ratten führte durch BMP-2 Prozessierung zu keinen Unterschieden in der ektopischen Knochenformation. Diese Befunde

zeigen, dass die Prozessierung der applizierten Proform auch *in vivo* greifen und die biologische Aktivität eintritt.

Durch die bisherigen Erkenntnisse, dass FSAP eine zirkulierende Serinprotease mit breitem Substratspektrum ist (Kapitel 1.3.3-1.3.5), kommt die Überlegung auf, inwiefern FSAP eine gesonderte Rolle in der Proproteinregulation ausführt. Die vergleichende Analyse mit weiteren Proteasen identifizierte Plasmin ebenfalls als Aktivator. Beim Vergleich der Plasmin induzierten pro-BMP-2 Spaltung stellte sich heraus, dass Plasmin nur eine Spaltstelle innerhalb der reifen BMP-2 Kette aufweist. Wie in Abb. 43 zusammengefasst, ist diese Spaltstelle im Vergleich zu FSAP um eine Aminosäure verschoben.

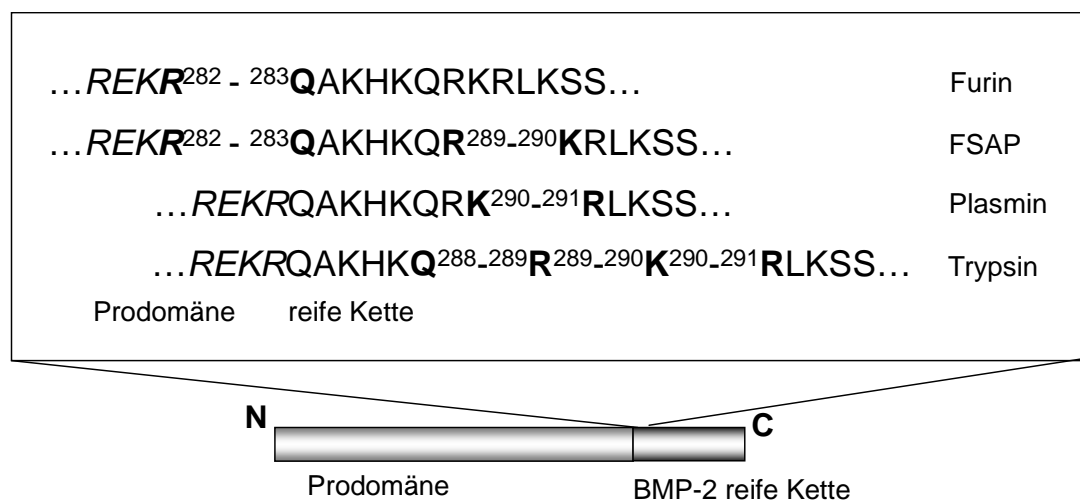


Abb. 42. Vergleich der bisher identifizierten Spaltstellen von pro-BMP-2. Die Furinspaltstelle der Prodomäne ist kursiv dargestellt, die Proteolyse der Aminosäuresequenz in fett dargestellt. Aminosäuresequenz von Uniprot.org entnommen (Eintrag P12643).

Demnach kommt es bei Plasmin Behandlung nicht zur Generierung eines Zwischenprodukts (Abspaltung der Prodomäne) sondern zur sofortigen Prozessierung innerhalb der reifen Kette. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Backes und Mitarbeiter 2000 überein indem Plasmin nicht innerhalb des RXXR Motifs spaltet.

Desweiteren zeigt die vorläufige Analyse der Bindungsaffinität von FSAP an die Proform bzw. die reife Form Unterschiede auf. Obwohl die Affinität des BMP Inhibitors Noggin zu pro-BMP-2 und BMP-2 gleich war (Hauburger et al., 2009), wies FSAP unterschiedliche Affinitäten zwischen pro-BMP-2 und BMP-2 auf. In der vorliegenden Arbeit wurde keine detaillierte Bindungsstudie durchgeführt, doch gewähren diese vorläufigen Daten den Eindruck einer höheren Affinität zwischen FSAP und BMP-2 als zu pro-BMP-2. Dies könnte zwei Ursachen haben. Zum einen durch eine stöchiometrische Blockade der FSAP-

Bindestelle durch die große Prodomäne, zum anderen könnte reifes BMP-2 eine andere Konformation vorweisen. Bisher ist lediglich die Sekundärstruktur des reifen BMP-2 aufgeklärt (Scheufler et al., 1999) und die der Proform ist noch unbekannt. Durch die Strukturanalyse von pro-TGF- β stellte sich jedoch heraus, dass die Prodomäne sich ringförmig um die reife Kette schließt, und dadurch dessen Struktur beeinträchtigt (Shi et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit erwies sich FSAP als ineffektiv auf die pro-TGF- β Aktivierung. Es lässt sich daher spekulieren, dass FSAP die Proform durch den LAP/LTBP-Komplex nicht spalten könnte. Die Proteinkonformation von pro-TGF- β ist im Vergleich zu pro-BMP-2 und pro-GDF-5 unterschiedlich und könnte den Zugang der FSAP inhibieren.

Weitere Indizien für den Vorgang der Konformationsänderung liefern die Erkenntnisse bei BMP-7. Auch hier kommt es nach Abpaltung der Prodomäne zu einer Konformationsänderung (Gregory et al., 2005). Da die Prodomäne eine wichtige Rolle für die Proteinstabilität und -Löslichkeit spielt, ist eine Konformationsänderung des reifen Peptids anzunehmen.

Daher lässt sich nur spekulieren, ob die Prodomäne die FSAP Bindung inhibiert. Gewiss ist jedoch dass die Zugabe von Heparin zu immobilisierten BMPs keinen Einfluss auf die FSAP-Bindung ausübt. Daher scheint es zu keinen Wettbewerb zwischen Heparin und FSAP um die heparinbindende Domäne des Wachstumsfaktors zu kommen.

Außer der Studie von Hillger und Mitarbeiter gibt es bisher keine umfassenden Studien zur pro-BMP-2 Aktivierung. Es wurde lediglich zu den Drosophila Homologen von BMP-5/6/7/8 eine Analyse der Proproteinprozessierung durchgeführt (Fritsch et al., 2012). Erstaunlicherweise kommt es bei diesen Homologen nicht nur zur Prodomänabspaltung der reifen Ketten durch Proproteinkonvertase, sondern auch zu weiteren Spaltungen (RXXR) innerhalb der Prodomäne. Die Autoren benannten die Seiten als „*Pro- Main-* und *Shadow-Spaltstellen*“ (Fritsch et al., 2012). Diese Varianten der Furinproteolyse könnten Einfluss auf die biologische Aktivität haben, je nach Spaltung und Peptidlänge könnten sie für die extrazelluläre lange oder kurze Reichweiten-Gradientenbildung wichtig sein (Fritsch et al., 2012; Künnapu et al., 2009; Sopory et al., 2010). Für pro-BMP-4 wurde die S2 Spaltstelle für Furin gründlich untersucht (RISR), die ebenso in pro-BMP-2 konserviert vorliegt (²⁴⁵RISR²⁴⁸, Uniprot.org Eintrag P01137) (Sopory et al., 2010). FSAP ist demnach neben Trypsin der zweite extrazelluläre pro-BMP-2 Aktivator, der mehrere Spaltstellen aufweist, die sowohl in der Prodomäne als auch in der reifen Kette vorliegen.

Neben der Proform von BMP-2 wurde auch die Proform von GDF-5 durch FSAP gespalten und aktiviert. Für pro-GDF-5 wurde ebenfalls eine Proproteinkonvertase vermittelte

posttranslationale Modifikation beschrieben (Kapitel 4.2). Interessanterweise liegt die heparinbindende Domäne bei GDF-5 nicht innerhalb der reifen Kette, sondern in der Prodomäne (²³⁹LRILRKKP²⁴⁶) (Plöger et al., 2008; Cardin and Weintraub et al., 1989). Mutationen innerhalb der Prodomäne von GDF-5 können zu schweren Skelettschädigungen führen (Storm and Kingsley 1994). Die Tatsache, dass FSAP pro-GDF-5 spaltet und aktiviert ergänzt die Untersuchungen zur Proform Aktivierung von Plöger et al., 2008 (Furin, MMP3 und Trypsin, Abb. 43). Bisher konnte eine N-terminale Sequenzierung des pro-GDF-5 Spaltprodukts anhand von dem geringem Ausgangsmaterial (freundliche Gabe von F. Plöger) leider nicht durchgeführt werden. Beim Vergleich der generierten Spaltprodukte mittels Western blot Analyse fällt jedoch auf, dass das gespaltene pro-GDF-5 Peptid etwas kleiner ist, als die reife GDF-5 Form (Abb. 38). Dies lässt vermuten, dass FSAP ähnlich wie bei pro-BMP-2, zu einer Spaltung innerhalb der reifen Kette führt. Daher stelle ich hier die Vermutung auf, dass es sich bei der Spaltung um die Position K³⁹⁰-R³⁹¹ handeln könnte (Abb. 43). Um dies zu bestätigen, müsste jedoch das Produkt N-terminal sequenziert werden. In Abb. 44 sind die bisher bekannten Spaltstellen von pro-GDF-5 zusammengefasst.

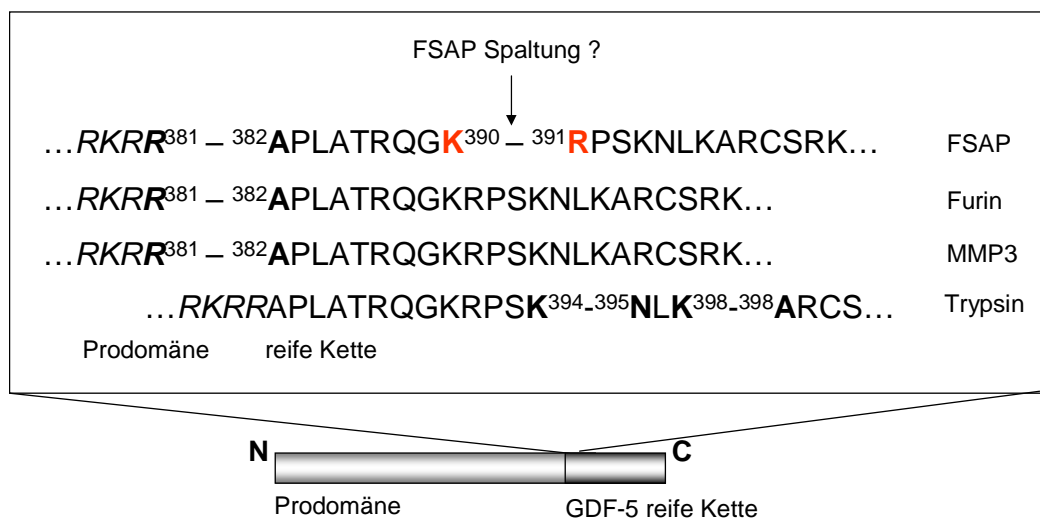


Abb. 43. Vergleich der bisher identifizierten Spaltstellen von pro-GDF-5. Die Furinspaltstelle der Prodomäne ist kursiv dargestellt, die Proteolyse der Aminosäuresequenz ist fett dargestellt. Die FSAP Spaltung könnte in Analogie zu pro-BMP-2 bei Position K³⁹⁰-R³⁹¹ erfolgen (rot dargestellt). Aminosäuresequenz von Uniprot.org entnommen (Eintrag P43026).

Eine Optimierung der GDF-5 Aktivität ist von wissenschaftlicher Bedeutung, da es zukünftig auch zu ektopischen Knochenbildungsprozessen eingesetzt werden könnte. Kasten et al., 2010 gelang es bereits durch Punktmutationen (M453V und M456V) die Affinität zum BMPRI zu erhöhen, was eine erhöhte ALP Induktion sowie Knochenregeneration nach sich zog.

Es lässt sich zusammenfassen, dass FSAP ein neuer Aktivator von latenten pro-BMP-2 und pro-GDF-5 ist, und die Generierung von biologisch stark aktiven Peptiden fördert. Dies liefert wichtige Erkenntnisse für die Generierung von rekombinanten BMPs zu Therapie Zwecken beim Knochenmetabolismus oder der Gewebereparatur.

6.3. Mutationstudie der pro-BMP-2 Spaltung durch FSAP

In einer detaillierten Mutationssstudie sollten die verantwortlichen Aminosäurereste für die pro-BMP-2 Aktivierung durch FSAP Proteolyse ermittelt werden.

Die vorliegende Arbeit bringt vier wichtige Aspekte hervor: (1) durch rekombinante Expression von pro-BMP-2 wurde bestätigt, dass die Proform in geringen Mengen sekretiert wird (3) die posttranslationale Modifikation von pro-BMP-2 durch Furin (S1) nicht essentiell zur Protein-Qualitätskontrolle bzw. –Sekretion ist (4) das FSAP Erkennungsmotif außerhalb der pro-BMP-2 bzw. BMP-2 Spaltstelle liegt.

Die rekombinante Expression in eukaryotischen Zellen bestätigte vorherige Befunde, dass nicht nur die reife Form, sondern auch die inaktive Proform in geringer Menge sekretiert wird (Lories et al., 2003; Zhou et al., 2012). Dies bekräftigt die Bedeutsamkeit der extrazellulären Proform Aktivierung. Interessanterweise führte die Klonierung von reifen BMP-2 zu keiner Proteinexpression (Daten nicht gezeigt), diese ist erst nach Anfügen der Prodomäne sequenz nachweisbar. Dies könnte ein Beweis sein, dass die Prodomäne wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben für die Proteinqualität zuständig ist. Die Klonierung des Signalpeptids mit Prodomäne wurde in der Literatur als unterstützend für die BMP-2 Expression angesehen (Wang et al., 2012; Peng et al., 2001).

Die Zugabe von FSAP führte beim pro-BMP-2 Wildtyp sowie bei den Mutanten zu einer Spaltung und der Aktivierung des Peptids. Leider gelang es nicht, durch Einzelmutationen die FSAP Proteolyse zu inhibieren. Daraus lässt sich schließen, dass FSAP mehrere Aminosäurereste für die gerichtete Spaltung erkennen muss. Dies könnte auch ein Grund sein, warum FSAP nicht die putativ vorgeschlagenen Sequenzen von TGF- β -1 und PDGF-BB spaltet (Kapitel 6.1 und 6.2).

Interessant sind auch die Befunde zur Mutationsstudie der Furinspaltstelle innerhalb der Prodomäne. Die Mutationen K278S und R282S hatten keine Auswirkungen auf die Sekretion des prozessierten Wachstumsfaktors. Dies ist verwunderlich, da die Zugabe von Furininhibitor die Sekretion der Proform begünstigte, und somit für eine *Beteiligung von Furin* am Prozessierungsvorgang spricht. Die Spaltung durch Proproteinkonvertasen scheint komplexer zu sein, als anfangs angenommen. Für eine effiziente Spaltung ist nicht nur das

RXXR Motif essentiell, sondern auch die 20 umliegenden Reste P14 bis P6' (Tian et al., 2012). Dies wird bei der Diversität der Cystein-Knoten-Protein Prozessierung deutlich: So wird pro-BMP-4 durch Furin, PC6 und PC7 gespalten (Nelsen and Christian 2009), pro-BMP-10 hauptsächlich durch Furin (Susan-Resiga et al., 2011), pro-GDF-11 durch PC5/6 (Essalmani et al., 2008) und VEGF-C durch Furin sowie PC5 und PC7 (Siegfried et al., 2003). Proproteinkonvertasen bevorzugen an der Spaltstelle Position P1 kleine hydrophile Reste, weiterhin dulden sie negativ geladene Reste (Tian et al., 2012). Bei Position P2' werden aliphatische oder hydrophobe Reste bevorzugt, von P3'-P6' kleine hydrophile Reste (Tian et al., 2012). Bisher liegen keine ausführlichen Daten über die pro-BMP-2 Prozessierung durch Proproteinkonvertasen vor, lediglich zu seinem nahem Verwandten pro-BMP-4 (Nelsen and Christian 2009). Da sich pro-BMP-4 jedoch in seinen flankierenden Sequenzen von pro-BMP-2 unterscheidet (Abb. 6), könnte sich der Prozessierungsprozess bei ihnen unterscheiden. Nelson and Christian 2009 gelang es ebenfalls durch Mutation der Furin Spaltstelle von pro-BMP-4 die Proteolyse zu inhibieren. Dies gelang durch Mutation der Furin Spaltstelle von RXXR zu RXXG sowie GXKR. Die Spaltung durch die Proproteinkonvertase PC7 blieb hier aus (Nelson and Christian 2009). Bei pro-BMP-10 wurde Furin als Hauptsalter identifiziert (**RIRR**³¹⁶⁻³¹⁷NAKG) (Susan-Resiga et al., 2011). Die Einzelmutationen AIRR³¹⁶, RIRA³¹⁶ sowie die Doppelmutation AIRA³¹⁶ führten zur vollständigen Inhibierung der Prozessierung (Susan-Resiga et al., 2011).

Die pro-BMP-2 Prozessierung durch Proproteinkonvertasen ist bisher kaum verstanden. In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Triple-Mutante SSS²⁸² der Prodomäne gezeigt werden, dass es zu starken Unterschieden in der Sekretion der Proform und der reifen Kette im Vergleich zu anderen pro-BMP-2 Varianten kommt. Zwei Punkte sind hier zu hervorzuheben: (1) ohne Furininhibitor Behandlung ist die Sekretion von reifer Kette sowie Proform kaum detektierbar und es kommt zur Akkumulation im Zellextrakt (2) die Sekretion der Proform wird scheinbar durch Furin kontrolliert, auch wenn dessen Spaltstelle mutiert wurde.

Da die Sekretion in Anwesenheit von Furin auf ein Minimum reduziert ist, liegt die Vermutung nahe, dass während der Qualitätskontrolle im sekretorischen Weg die mutierte Furinspaltstelle erkannt und das Protein abgebaut wird. Dabei stellt sich die Frage, welche Rolle endogenes Furin spielt, da bei dessen Inhibierung die Sekretion der SSS²⁸² Mutante vollzogen wird. Laut Literatur wurde eine weitere Furin Spaltstelle (S2: RISR) bei pro-BMP-4 identifiziert, die oberhalb der S1 Spaltstelle liegt (Sopory et al., 2010, Cui et al., 1998). Die S1 Spaltstelle bei pro-BMP-4 (RAKR) führt zu einer nicht-kovalenten Bindung der Prodomäne an die reife Kette. Dieser verbundene Komplex kann anschließend durch

Proteolyse der S2 Spaltstelle gelöst werde, und die reife Kette wird freigelassen (Cui et al., 1998; Cui et al., 2001). Bei einer Inhibierung der S1 oder S2 Spaltstelle führt dies zur Protein Degradation oder dem Verlust der Aktivität (Degnin et al., 2004).

Eine neue Studie zur Spaltung und Sekretion von pro-BMP-2 weist eine 3. Spaltstelle auf. Bei S3 handelt es um die Sequenz RPLLV²⁶⁵, bei dessen Spaltung ein 20 kDa großes Peptid mit der Anfangssequenz TFGHD²⁷⁰ generiert wird (Zhou et al., 2012). Die dafür verantwortlich Protease wurde jedoch nicht identifiziert. Es ist nicht auszuschließen, dass es in der vorliegenden Studie durch die Triple-Mutation SSS²⁸² ebenfalls zu einer alternativen Spaltung kommen könnte. Bei der Western blot Analyse (Abb. 35) ist es durch die geringe Menge an sekretierten prozessierten BMP-2 schwierig, eine Aussage über ein leicht erhöhtes Molekulargewicht (zusätzliche 17 Aminosäuren) zu treffen. In den Zellextrakten war allerdings ein kleines Peptid akkumuliert vorzufinden (Abb. 35 B weißer Pfeil), was für eine intrazelluläre S3 Prozessierung sprechen könnte. Zhou et al., 2012 diskutierten, dass diese zusätzlichen N-terminalen 17 Aminosäuren (2 kDa in eukaryotischen Zellen) ein „linker Peptid“ darstellen könnte, dass für die Proteinstabilität und –Degradation wichtig sein könnte. Auf die biologische Aktivität hatte es außerdem eine inhibierende Wirkung (Zhou et al., 2012).

Um die genauen Spaltstellen in der vorliegenden Mutationsstudie zu identifizieren, müssten die Peptide N-terminal sequenziert werden, was nur durch Aufreinigung mittels Affinitäts-Tag am C-Terminus der pro-BMP-2 Varianten möglich wäre. Eine Umklonierung in einen Vektor mit angefügtem Tag hätte auch den Vorteil, nach der Aufreinigung eine biochemische Bindungsstudie mit FSAP durchzuführen (Bindungs-ELISA). Dabei könnten alle hier generierten pro-BMP-2 Varianten miteinander verglichen werden.

Durch die initiale Charakterisierung der Triple-Mutante SSS²⁸² wurde außerdem die Frage aufgeworfen, warum durch Furininhibitor Behandlung die Sekretion der Proform rapide ansteigt. Schließlich sollte durch Mutation der S1 REKR die Erkennung durch Furin unterbunden sein. Wie bereits obig dargestellt, ist die Diversität der pro-BMP und pro-GDF Prozessierung durch Proproteinkonvertasen sehr stark. Um die intrazelluläre pro-BMP-2 Spaltung genauer zu untersuchen, könnten unterschiedliche eukaryotische Zellen zur Expression verwendet werden. Im direkten Vergleich zu HEK293 Zellen, die alle üblichen Proproteinkonvertasen exprimieren, könnte eine Vergleichsstudie mit Furin-defizienten LoVo Zellen (Takahashi et al., 1993; Takahashi et al., 1995) durchgeführt werden, sowie COS-1 Zellen, die keine PC5/6 exprimieren (Mayer et al., 2003; Seidah et al., 1994).

Offen bleibt außerdem die Frage, warum durch die Triple-Mutation SSS²⁸⁹ der reifen Kette die Proteolyse durch FSAP ausblieb, jedoch nicht bei der Triple-Mutante der Prodomäne.

Beispielsweise wurde bei Mutationsstudien des Cystein-Knoten Proteins pro-BDNF festgestellt, dass die Mutation von RVR¹²⁸ zu RVAA¹²⁸ sowie AVAA¹²⁸ innerhalb der Furin Spaltstelle vor der extrazellulären Proteolyse durch Plasmin schützt und zu einer vollständigen Proformsekretion in den Überstand führte (Gray and Ellis 2008).

Eine genauere Betrachtung der Aminosäureeigenschaften innerhalb der FSAP/BMP Interaktionsstelle gibt leider keine neuen Indizien (Abb. 44). Als Gemeinsamkeit sind in Position P1 basische Arginin oder Lysin Reste vertreten. Die übrigen Aminosäuren zeigen jedoch hohe Diversität. Lediglich in P3 kommt es bei bei TFPI und PDGF-B Spaltung vermehrt zu einem Isoleucin (Abb. 44).

Identifizierte Spaltstellen einiger FSAP Substrate									
P 4 3 2 1					1'2'3'4'				
R I I K ^{87 - 88}					T T L Q				
G I C R ^{108 - 109}					G Y I T				
G L C R ^{200 - 201}					A N E N				
L I D R ^{113 - 114}					T N A N				
E I V R ^{160 - 161}					K K P I				
I V R K ^{162 - 162}					K P I F				
R E K R ^{282 - 283}					Q A K H				
H K Q R ^{289 - 290}					K R L K				

Abb. 44. Bisher identifizierte Spaltstellen der FSAP Substrate. Dargestellt sind die Spaltstellen von TFPI (Kanse et al., 2012), PDGF-B (Shibamiya et al., 2007) und BMP-2 (Uniprot.org Eintrag P12643).

Da FSAP jedoch die Triple-Mutante der reifen Kette nicht mehr prozessiert, scheinen andere, unbekannte Mechanismen an der FSAP induzierte Proteolyse beteiligt zu sein (z.B. Proteinkonformation). Um dies zu studieren, müsste die Mutationsstudie ausgedehnt werden. Da FSAP eine Vielzahl von Proteinen proteolytisch spaltet (Wachstumsfaktoren, Gerinnungsfaktoren, Metalloproteinasen, Komplementfaktoren), deutet dies auf eine breite Substratspezifität hin. Um die favorisierte Proteolyse der FSAP zu bestimmen, könnte daher in Zukunft eine Peptidbücherei getestet werden, um die Spaltstellen genauer zu definieren.

6.3 FSAP als Risikofaktor der vaskulären Kalzifizierung und Arteriosklerose

Neueste Befunde identifizierten den FSAP SNP Marburg I in Assoziation mit vaskulärer Kalzifizierung und Arteriosklerose (Gardener et al., 2011; Zakai et al., 2011). Adaptiert man das vorherige Modell der FSAP induzierten PDGF-BB Inhibierung *in vivo*, könnte ein ähnlicher Mechanismus für BMP-2 oder GDF-5 angenommen werden. BMP-2 und GDF-5 sind für Remodellierungsvorgänge zuständig (Liu et al., 2009). Wie Eingangs bereits beschrieben, ist BMP-2 ein wichtiger Akteur in der Initiation von vaskulärer Kalzifizierung (Kapitel 1.2 und 1.4.3).

Doch wie kommt es zur Assoziation von vaskulärer Kalzifizierung mit Marburg I? Die gewonnenen Daten dieser Arbeit implizieren, dass *proteolytisch aktive* FSAP die Kalzifizierung durch BMP-2 Aktivierung vorantreiben könnte, jedoch nicht durch Marburg I. Die Verbindung von Marburg I mit vaskulärer Kalzifizierung scheint daher nicht nur durch Wechselwirkung mit den hier untersuchten Cystein-Knoten Proteinen abhängig zu sein.

BMP-2 könnte daher einer von mehreren Faktoren sein. Um den Zusammenhang zwischen der BMP-2 Aktivierung und der Kalzifizierung zu untersuchen, stehen einige zukünftige Untersuchungen an, da die hier gewonnenen Einblicke lediglich auf ein isoliertes *in vitro* System beschränkt sind.

Die vaskuläre Kalzifizierung kann durch folgende Faktoren beeinflusst werden: (1) Verlust von Kalzifizierungsinhibitoren (2) Induzierer der Knochenbildung (3) zirkulierende nukleäre Komplexe (4) Zelltod (5) gestörter Kalzium/Phosphat Gehalt im Serum (Giachelli 2004) (Kapitel 1.2).

Aus dieser Auflistung der verschiedenen Faktoren wird schnell klar, dass es sich hier um einen komplexen pathologischen Mechanismus handelt. In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass FSAP einen Einfluss auf die BMP-2 Aktivität als knochenformender Faktor aufweist. Im folgenden Abschnitt soll daher diskutiert werden, inwiefern FSAP bzw. Marburg I eine Rolle in der Entstehung von vaskulärer Kalzifizierung ausüben könnte.

Um einen Hinweis auf die FSAP modulierte BMP-2 Wirkung in der Gefäßwand zu erhalten, wurden Studien mit VSMCs herangezogen. Diese Zellen reagierten mit gesteigerter BMP-Signalkaskade, sowie der Induktion des Zellzykluskontrollgenes Id1 und inhibitorischen Smad6 (Kapitel 1.4.1). Das Id1 Transkript wird ebenfalls durch BMP-2 Stimulierung in C2C12 Zellen hochreguliert. Hier inhibiert Id1 die Myogenese und fördert stattdessen die Differenzierung zu Osteoblasten (Katagiri et al., 2002) (Kapitel 1.4.1). Daher wird die Frage aufgeworfen, ob Id1 auf VSMCs in einen ähnlichen Weg wirkt. Betrachtet man die

Entstehung von Arteriosklerose und vaskulärer Kalzifizierung (Kapitel 1.1 und 1.2) sind zwei Schritte von enormer Bedeutung: Proliferation und Differenzierung der Zielzellen, insbesondere der VSMCs.

Es häufen sich die Befunde, dass bei arterieller Gefäßverletzung, die zur Neointimabildung führen, die Diversität der beteiligten VSMCs groß ist, und der Ursprung dieser Zellen variiert. Für die arterielle Remodellierung werden wahrscheinlich auch zirkulierende knochenmarkentsprungene mononukleare Zellen (BMMCs) herangezogen (Daniel and Sedding 2011). Solche unausdifferenzierten Vorläuferzellen können durch Stimulierung von Cystein-Knoten Proteinen wie TGF- β -1 oder PDGF-BB zu VSMCs differenzieren (Fadini and Tjwa 2010).

Id Proteine können Zellwachstum, Differenzierung sowie neoplastische Transformation einleiten (Norton et al., 2000). Die Differenzierung der VSMCs und ihre Transformation während Gefäßerkrankung in einen neuen Phänotyp sind bisher kaum verstanden. Es häufen sich jedoch die Befunde, dass es sich bei diesen Zellen um osteochondrogene Vorläuferzellen handelt, die während der vaskulären Kalzifizierung zu Chondrozyten differenzieren (Speer et al., 2009). Auch bei der Arteriosklerose ist die Transdifferenzierung der VSMCs vom ruhigen kontraktile Phänotyp zum stark proliferativen Phänotyp zu beobachten (Owens et al., 2004) (Kapitel 1.1). Diese Plastizität der Zellen ist wichtig für die strukturelle und funktionelle Integrität des Gefäßsystems, die nach Verletzung wieder hergestellt werden muss (Speer et al., 2009). Bei der Transdifferenzierung dieser Zellen zum chondrogenen Phänotyp werden typische Knochen- und Knorpelgene induziert (ALP, Knochen Sialoprotein, TypII Kollagen) die durch osteoblast- und chondrogenspezifische Faktoren reguliert werden (Runx2/cbfa1, BMP-2, Msx2, Osterix, Sox9) (Chen et al., 2012; Speer et al., 2009) (Kapitel 1.2 und 1.4.3). Multipotente mesenchymale Vorläuferzellen wurden in Läsionen der vaskulären Kalzifizierung detektiert, und könnten als perizytähnliche Zellen an der Entstehung von kalzifizierten Nodulen beteiligt sein, und osteoblastähnliche Eigenschaften aufweisen (Speer et al., 2009). Demnach könnten zwei Zellpopulationen an der Initiation von Arteriosklerose und vaskulärer Kalzifizierung beteiligt sein: reife VSMCs und unreife multipotente mesenchymale Vorläuferzellen aus der Zirkulation (Speer et al., 2009).

Welchen Einfluss könnte FSAP auf die Transdifferenzierung dieser Zellpopulation haben?

Hier spekuliere ich, dass FSAP über die Wechselwirkung mit BMP-2 sowie PDGF-BB auf die osteoblastähnliche Differenzierung einwirken könnte. Über die FSAP induzierte Aktivitätssteigerung von BMP-2 könnte die Induktion der osteoblastmodulierenden Transkriptionsfaktoren sowie Matrixproteine induziert werden. PDGF-BB wirkt über ERK1/2

Signalweg (Wang et al., 2004). Gesteigerte ERK1/2 Phosphorylierung führt in VSMCs ebenfalls zur Hochregulation von Runx2/Cbfa1, sowie zu einer Herunterregulierung von typischen VSMC-Markergenen, was die Phänotyptransition in Richtung Osteochondrozyten Vorläufer vorantreibt (Wang et al., 2004). Da FSAP jedoch PDGF-BB inhibiert, würde es hier zu einer veränderten Balance kommen: die Signaltransduktion des ERK1/2 Signalwegs würde durch inhibiertes PDGF-BB schwächer ausfallen, durch die BMP-2 Aktivierung würde jedoch eine verstärkte Smad-Phosphorylierung und osteoblastähnliche Transdifferenzierung gefördert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem die Erkenntnis gewonnen, dass TGF- β -1 kein Substrat der FSAP ist. Die TGF- β s weisen im Vergleich zu den BMPs eine andere biologische Wirkung auf die osteoblastähnliche Zelldifferenzierung auf (Katagiri et al., 1994). Sie wirken im gegensätzlichen Weg zu den BMPs, indem sie die Differenzierung und Reifung aufhalten (Spinella-Jaegle et al., 2001). Da FSAP jedoch nicht die biologische Aktivität von TGF- β -1 steigert, wie es bei BMP-2 und GDF-5 beobachtet wurde, scheint es hier zu keinen verstärkten antagonistischen Effekten in der Osteoblastdifferenzierung zu kommen. Wie bereits in Kapitel 1.1 erläutert, ist TGF- β -1 vielmehr an der Entstehung der Arteriosklerose beteiligt, wo es vor allem mit oxLDL, MCP und infiltrierten Monozyten/Makrophagen interagiert. Natürlich ist hier zu bemerken, dass es sich bei den arteriosklerotischen Plaques um starke Kalziummineraleinlagerungen handelt, dessen Quelle auch unreife Osteoklasten sind, die durch Stimuli (*macrophage colony-stimulating factor* und RANKL) reifen (Demer and Tintut 2011; Matsuzaki et al., 1998).

Neben der BMP-2 induzierten endochondralen Ossifikation durch Osteoblastdifferenzierung vermögen die GDFs die Chondrogenese anzutreiben (Leboy et al., 2001; Francis-West et al., 1999; Storm and Kingsley 1999). Hier könnte FSAP dual wirken: zum einen die Osteoblast-, und zum anderen die Chondrogendifferenzierung regulieren.

Bei Marburg I als Risikofaktor der vaskulären Kalzifizierung und Arteriosklerose (Gardener et al., 2011) wäre dieses Verhältnis umgekehrt, und der BMP-2 Signalweg daher reduziert. Dies stünde im Gegensatz zu der These des Marburg I Risikofaktors.

Vielleicht könnte dieses Paradoxon durch eine ganz andere Ursache erklärt werden. Bei Betrachtung der ektopischen Knochenbildung fällt auf, dass eine gestörte Balance zwischen Knochenaufbau und Resorption zu einer Reduktion der Knochenmasse führt, der sogenannten Osteoporose (Persy and D’Haese 2009).

Diese gestörte Knochenbildung ist oft bei Patienten mit chronischer Nierenkrankheit anzutreffen, oder bei postmenopausalen Frauen (Toussaint et al., 2008; Kado et al., 2000). Paradoxerweise führt der Knochenabbau zu gesteigerter vaskulärer Kalzifizierung, was vor

allem durch gesteigerte Kalzium/Phosphat Serumspiegel (wie bereits oben erwähnt, Einleitung Kapitel 1.2), sowie hohe Parathyroid Hormon (PTH) Konzentration vorangetrieben wird.

Interessanterweise gibt es eine Assoziation zwischen dem Hormonhaushalt von Frauen und FSAP Antigen und Aktivität (Riondino et al., 2012; Parahuleva et al., 2010). FSAP scheint durch Östrogen und Progesteron Spiegel hochreguliert, und durch Monozyten exprimiert zu werden (Parahuleva et al., 2010). Frauen mit sinkendem Östrogenspiegel haben ein höheres Risiko Osteoporose zu erleiden (Kado et al., 2000). Östrogen reguliert den Knochenmetabolismus und inhibiert vaskuläre Läsionen (Abb. 45), daher kommt es bei postmenopausalen Frauen häufig zur Knochenerosion und Kalzium/Phosphat Ansammlungen im Gefäßsystem (Kiel et al., 2001). Es bleibt zu spekulieren, ob FSAP die protektive Wirkung von Östrogen im Knochenmetabolismus unterstützt. Dazu müssten FSAP Antigen und Aktivität in menopausalen Frauen ermittelt werden, und ein Vergleich zwischen der Knochenerosion und Kalzium/Phosphat Gehalt im Serum vollzogen werden.

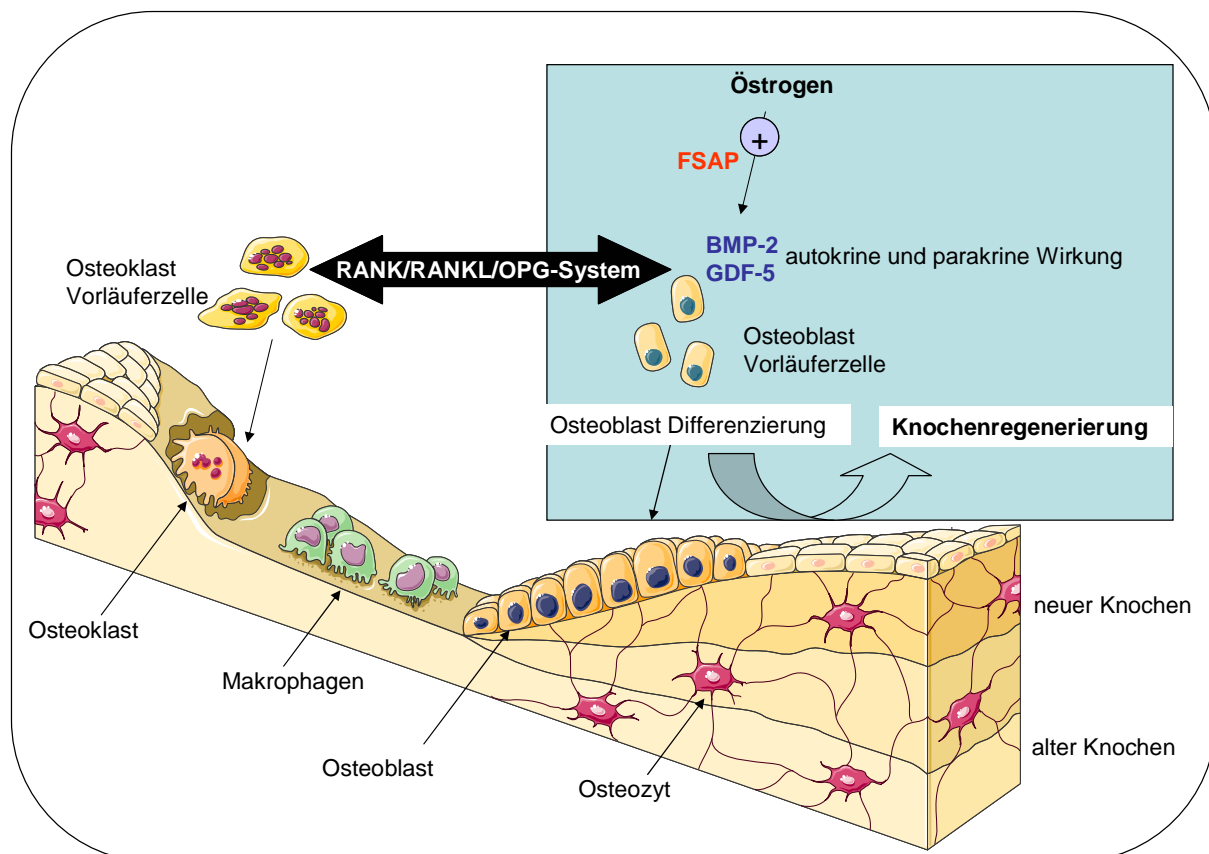


Abb. 45. Putativer Regulationsmechanismus der Osteoblasten Differenzierung durch FSAP. Der Knochenmetabolismus wird durch die Balance von Osteoblasten und Osteoklasten aufrechterhalten. Die Homeostase wird durch das RANK/RANKL/OPG System reguliert. Östrogen wirkt positiv auf den Knochenmetabolismus durch Wirkung auf die Osteoblasten. Desweiteren fördert Östrogen die FSAP Expression, das wiederum die BMP-2 Aktivierung fördert und somit in diesem Modell die chondrogene Differenzierung fördern könnte.

Vereinend in der Pathologie der vaskulären Kalzifizierung und Arteriosklerose sind Remodellierungsprozesse, die vor allem durch Proliferation und Migration von VSMCs initiiert werden. Die Proprotein Aktivierung ist hier von zentraler Bedeutung, da viele vaskuläre Remodellierungsfaktoren latent sekretiert werden, neben den Cystein-Knoten Proteinen auch Pro-Integrine und Pro-Matrixmetalloproteinasen (Stawowy and Kapper 2011). Bisher galten Furin und PC5 als die Hauptakteure der Proprotein Aktivierung, da sie im Atheroma und in infiltrierenden Makrophagen exprimiert werden (Stawowy et al., 2005). Doch nach den neuesten Befunden scheint die Proprotein Aktivierung nicht nur hauptsächlich intrazellulär beschränkt zu sein, sondern durch extrazelluläre zirkulierende Proteasen wie beispielsweise FSAP oder Plasmin reguliert zu werden. Diese Proteasen könnten durch gezielte Proteolyse die Stabilität der fibrösen Kappe des Plaques regulieren. TGF- β -1 ist zwar maßgeblich an der Phänotyp Transition der VSMCs bei Gefäßläsion beteiligt (stimuliert Kollagensynthese), sowie bei der Regulation der T-Zell Antwort (Bobik 2006), jedoch nimmt pro-TGF- β durch den LAP/LTBP Komplex eine einzigartige Stellung der Proform Stabilität ein. TGF- β als potentieller Restenose Risikofaktor hat keine Verbindung mit FSAP als Stenose Risikofaktor (Willeit et al., 2003).

Da die vaskuläre Kalzifizierung die Kontraktilität der Gefäße beeinträchtigt, könnte hier ein erhöhtes Stenose Risiko erwartet werden. Überraschenderweise ergab eine Patientenstudie, dass die Kalzifizierung, und damit die Ablagerung von Bisphosphonat, eine protektive Wirkung auf degenerative Aortastenose ausübt (Innasimuthu and Katz 2011). Die genaue Wirkung des Bisphosphonats ist dabei noch nicht geklärt, die Autoren spekulieren jedoch über mögliche Therapieansätze durch dessen Applikation.

Fraglich ist außerdem, ob die inhibitorische Wirkung der FSAP auf VEGF (Jeon et al. 2006) auch eine Rolle im Gefäßsystem spielen könnte. Da das Cystein-Knoten Protein VEGF durch seine pro-angiogene Wirkung auch an der Atherogenese beteiligt ist (Vuorio et al., 2012), könnte es durch FSAP *in vivo* inhibiert werden, was FSAP zu einem protektiven Faktor machen könnte.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass FSAP durch BMP-2 die Differenzierung von Zellen unbekannten Ursprungs in chondrogene Zellen induzieren könnte. Ob dies den dynamischen Prozess der Knochenbildung beeinflusst oder die vaskuläre Kalzifizierung, bleibt zu spekulieren. Aus den oben vorgestellten Aspekten erschließt sich, dass die Knochenmineralisierung eng mit vaskulärer Kalzifizierung verknüpft ist.

Diese hier aufgestellten Vermutungen müssten durch zahlreiche Studien belegt werden. Zum einen könnte die Charakterisierung der vitalen FSAP^{-/-} Maus (Arbeitsgruppe Kanse) wichtige

erste Erkenntnisse bringen. Eine Bestimmung der Knochenmasse und –dichte könnte hier Aufschluss auf die Knochenerosion und –fragilität geben. Desweiteren könnte die Knochenregenerierung nach Knochenfraktur mit Wildtypmäusen verglichen werden. Außerdem könnte der Serumgehalt von Phosphat/Kalzium sowie ALP in FSAP^{-/-} mit Wildtyp Tieren verglichen werden.

Um den Einfluss von FSAP auf die BMP-2 getriebene chondrogene Differenzierung von VSMCs zu untersuchen, müssten *in vitro* Kalzifizierungsassays durchgeführt werden. Dies könnte anhand von radioaktiv markiertem Phosphat vollzogen werden (Schoppet et al., 2011). *In vivo* könnte die ektopische Knochenformation durch Implantate mit BMP-2 analysiert werden, wobei den Tieren FSAP bzw. Puffer appliziert wird.

Mit Hilfe der vorliegenden Arbeit wurde ein erster Einblick in eine mögliche Rolle der FSAP im Knochenmetabolismus sowie der arteriellen Remodellierung gewährt. Da Marburg I als Risikofaktor der vaskulären Kalzifizierung identifiziert wurde, sind die Aussichten auf weitere Wechselwirkungen der FSAP auf diesem Gebiet viel versprechend.

6.4 FSAP und die Stellung der TGF- β Superfamilien Regulatoren

Um die Wirkung der FSAP auf TGF- β Familienmitglieder zu untersuchen, wurden zur Vervollständigung reife Wachstumsfaktoren und deren inaktive Proformen zur Analyse herangezogen. Es ist soweit bekannt, dass Veränderungen der biologischen Aktivität von TGF- β , BMP-2 und GDF-5 mit diversen Erkrankungen assoziiert sind (z.B. Fibrose, pulmonare Hypertonie, vaskuläre Kalzifizierung, Brachydactyl Typ A2) (Benjamin 2012; Yamanaka et al., 2010; Seemann et al., 2005)

Da FSAP konstitutiv über Hepatozyten in die Zirkulation sekretiert wird, ist die Einzelkettenform jederzeit verfügbar. Verstärkt wird der FSAP Gehalt außerdem durch die Expression von Monozyten und Makrophagen, die durch pro-inflammatorisches Endotoxin reguliert werden kann (Parahuleva et al., 2010).

In Bezug auf arterielle Remodellierungsvorgänge trägt dies den Vorteil, dass FSAP bei Entzündungen (Plättchenaktivierung, Apoptose, Zellverletzung) von der Einzelkettenform in die Zweikettenform (Kapitel 1.3.2) aktiviert wird (Stephan et al., 2011), und lokal wirken kann. Durch die Infiltration von Makrophagen vermag „importiertes“ FSAP direkt im Gewebe zu wirken. Durch diesen Prozess könnte lokales FSAP protektiv bei der Atherogenese durch PDGF-BB Inhibierung wirken (Kanse et al., 2011; Sedding et al., 2004).

Im vorherigen Kapitel wurde der putative Einfluss der FSAP auf mesenchymale Vorläuferzellen, und die Auswirkung auf die Zelldifferenzierung diskutiert. Der

Knochenmetabolismus kann durch Expression von MMP-2 durch Osteoblasten reguliert werden (Innoue et al., 2006). Diese Metalloproteinase ist ein bekannter Aktivator von TGF- β (Thiolloy et al., 2012). Daraus erschließt sich, dass beispielsweise TGF- β durch die lokale Expression seines Aktivators prozessiert wird. Im Gegensatz dazu müsste FSAP erst zu seinem Bestimmungsort transportiert und anschließend lokal aktiviert werden. Neben diesen Beispiel dient das Gefäßsystem der weiteren Darstellung: Hier wird TGF- β außerdem durch Plasmin aktiviert, dass affin zur extrazellulären Matrix ist (George et al., 2005). Bei Gefäßverletzung kommt es zur Aktivierung der Plättchen, mit nachfolgender Degranulierung und Sezernierung von Plättchen TGF- β . TGF- β kann durch Plasmin aktiviert werden, da dieses gleichzeitig während die Blutgerinnung aktiviert wird (Grainger et al., 1995). Plasmin wirkt nun dual: zum einen löst es das Gerinnsel auf, zum anderen aktiviert es den Wachstumsfaktor zu Reparatur- und Regenerationsmaßnahmen. Auch findet wieder eine lokale Regulation statt. Desweiteren wird TGF- β durch Thrombospondin-1 aktiviert (Kapitel 1.4.2), das ebenfalls aus den Granula sekretiert wird (Crawford et al., 1998). Es scheint daher, als würde die TGF- β Aktivierung nur durch die zelluläre Mikroumwelt (z.B. Integrine, Fibrilline (Hyytiäinen et al., 2004)) reguliert zu werden, und nicht durch lösliche Proteasen wie FSAP.

Thrombospondin-1 aktiviert außerdem noch BMP-2 (Hayashi et al., 2012). Dieses Glykoprotein hat kalziumbindende Eigenschaften und hohe Affinitäten zu Matrixkomponenten wie Fibronectin oder Integrine (Tan an Lawler 2009). Dies unterscheidet es von FSAP: während FSAP ein lösliches Protein ist, kommt es bei Thrombospondin-1 zur einer möglichen Kolokalisation mit matrixgebundenen Cystein-Knoten Proteinen. Seine Expression durch Neutrophile, Plättchen, VSMCs, Makrophagen oder Fibroblasten (Lopez-Dee et al., 2011) könnte es zum direkten Konkurrenten von FSAP machen. Bestätigt wird diese Theorie, indem Thrombospondin-1 sowie FSAP voneinander unabhängig in arteriosklerotischen Plaques detektiert wurden (Roth et al., 1998, Parahuleva et al., 2008).

Aus dieser Gegenüberstellung geht hervor, dass die Zirkulation verschiedene Aktivatoren der TGF- β Superfamilie bereitstellt. Alle Aktivatoren werden bei Entzündungsreaktionen hochreguliert, was sie zu potenten Interaktionspartnern der Wachstumsfaktoren während Gefäßläsionen macht. Genaue Aussagen über die Stellung der FSAP innerhalb dieser Aktivatoren können nach der vorliegenden *in vitro*-Studie nicht getroffen werden. Dafür müsste die FSAP^{-/-} Maus charakterisiert werden (Kapitel 6.3).

Schlussfolgerung und Ausblick

Durch die vorliegende Studie konnte ein Einblick darüber gewonnen werden, durch welche molekularen Mechanismen FSAP Marburg I ein Risikofaktor der Arteriosklerose und vaskulären Kalzifizierung sein könnte. FSAP wurde als Aktivator der TGF- β Superfamilienmitglieder BMP-2, pro-BMP-2 und pro-GDF-5 identifiziert (Abb. 46). Diese Befunde ergänzen die bisherigen Erkenntnisse, dass FSAP ein Inhibitor des Wachstumsfaktors PDGF-BB ist, und dadurch vor fibrotischen Gefäßveränderungen schützen kann. Durch die Identifikation dieser neuen FSAP-Substrate wurde ein neuer *positiver* BMP Regulationsmechanismus aufgeklärt, da bisher nur wenig über die *Aktivierung* dieser latenten Proformen und reifen Wachstumsfaktoren bekannt ist.

Um die Relevanz der FSAP *in vivo* zu untersuchen, wären weitere Studien von Interesse (a) Charakterisierung der FSAP^{-/-} x ApoE Maus in Bezug auf Arteriosklerose und vaskulärer Kalzifizierung (b) Analyse des Knochenmetabolismus in der FSAP^{-/-} Maus und Regeneration nach Knochenfraktur (c) Bestimmung von zirkulierenden BMPs in FSAP^{-/-} Maus-Plasma sowie diverser Entzündungsparameter.

Durch die Balance von Wachstumsfaktor-Aktivierung und –Inhibierung vermag FSAP fibrotische und degenerative vaskuläre Erkrankungen zu regulieren, und hat somit hohes Potenzial als medizinisches Therapeutikum bei Arteriosklerose, vaskuläre Kalzifizierung oder Fibrose eingesetzt zu werden.

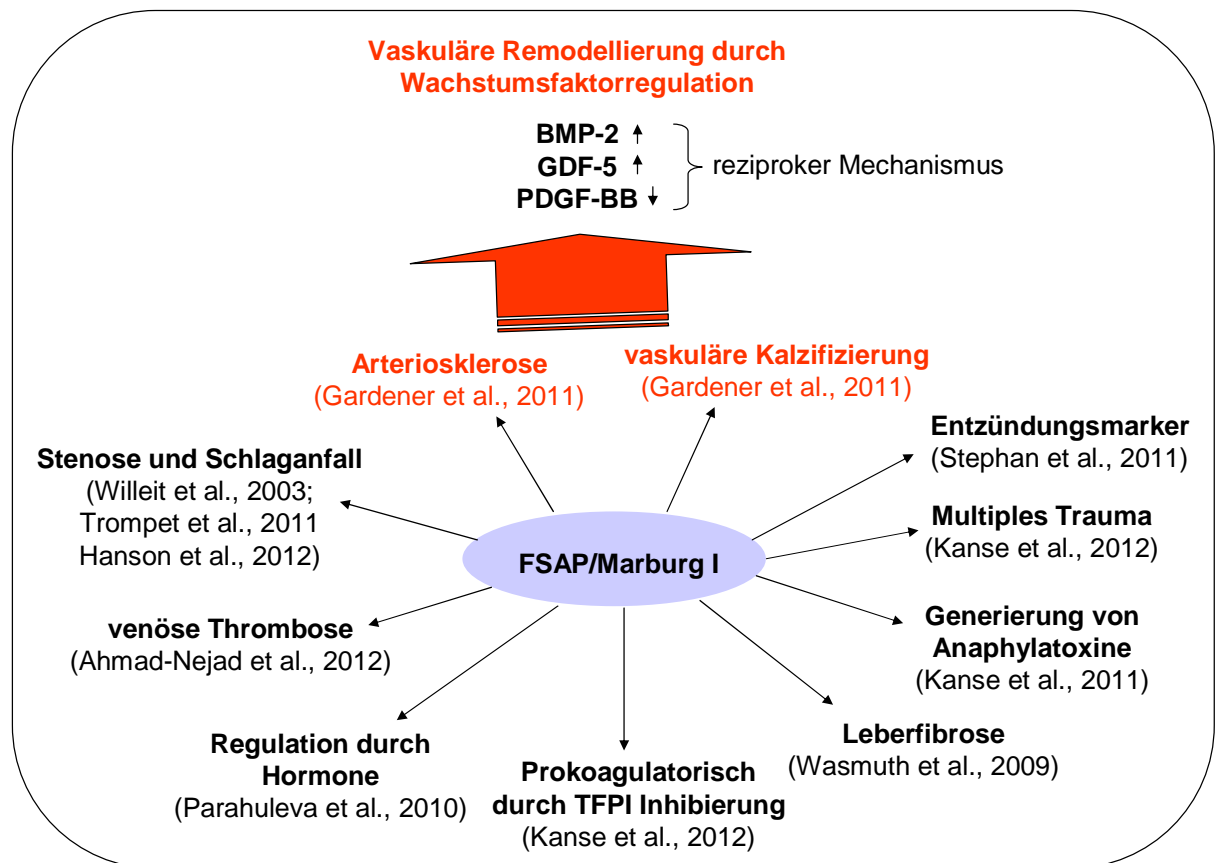


Abb. 46. Rekapitulation der FSAP Funktion und Marburg I als Risikofaktor. Durch die Regulation von Cystein-Knoten Proteinen und der Proprotein Aktivierung trägt FSAP bei vaskulären Remodellierungsvorgängen, wie bei der Arteriosklerose und der vaskulären Kalzifizierung bei. Durch die Assoziationen der Marburg I mit diversen Erkrankungen gilt die Forschung an FSAP als wegweisend um die komplexen Poteininteraktionen unter pathologischen Gesichtspunkten näher zu verstehen.

7 Zusammenfassung

Die Faktor VII-aktivierende Protease (FSAP) ist eine zirkulierende Serinprotease hepatischen Ursprungs. Der mit 5% Vorkommnis auftretende Einzelnukleotidpolymorphismus (G534E) „Marburg I“ der FSAP geht mit einer deutlich reduzierten Enzymaktivität einher, und korreliert mit diversen vaskulären Erkrankungen wie Arteriosklerose, vaskulärer Kalzifizierung und Fibrose.

Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten aufweisen, dass FSAP das Cystein-Knoten Protein *platelet derived growth factor* PDGF-BB degradiert, was eine Reduktion des fibrotischen Verhaltens von vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) im Mausmodell nach sich zog. Da FSAP Proteinaktivität im Zusammenhang mit fibroproliferativen und degenerativen Erkrankungen assoziiert ist, war es fraglich, ob FSAP weitere Mitglieder der strukturell verwandten *transforming growth factor*- β (TGF- β) Superfamilie der Cystein-Knoten Proteine reguliert. Dafür sollten deren reife Wachstumsfaktoren sowie ihre latenten Proformen untersucht werden.

In dieser Arbeit wurden Mitglieder der *bone morphogenetic protein* (BMP) und der *growth and differentiation factor* (GDF) Familie als neue Substrate der FSAP identifiziert, die im Zusammenhang mit osteogener Zelldifferenzierung stehen und anti-proliferativ wirken. In diversen *in vitro* Zellsystemen wurde der Einfluss der FSAP auf die biologische Aktivität von BMP-2, pro-BMP-2, pro-GDF-5 sowie TGF- β untersucht. FSAP spaltete und verstärkte die biologische Aktivität von reifen BMP-2 konzentrations- und zeitabhängig. Amino-terminale Peptid-Sequenzierung identifizierte eine Spaltung innerhalb basischer Aminosäuren und die Generierung eines um 7 Aminosäuren verkürzten Peptids (R²⁹⁸-K²⁹⁰). Ebenso wurden die latenten Proformen pro-BMP-2 und pro-GDF-5 prozessiert. Pro-BMP-2 wurde durch FSAP innerhalb der Furinspaltstelle RXXR in die reife Form überführt (R²⁸²-Q²⁸³) und zusätzlich an der gleichen Stelle wie reifes BMP-2 (R²⁸⁹-K²⁹⁰) verkürzt. Um die Spezifität der FSAP auf die Wachstumsfaktor Aktivierung zu überprüfen, wurde eine Vergleichsstudie mit diversen Proteasen durchgeführt. Lediglich strukturell verwandtes Plasmin stellte sich als BMP Aktivator heraus. Überraschenderweise erwies sich TGF- β -1 nicht als FSAP Substrat. Die biologische Aktivität der prozessierten Wachstumsfaktoren wurde durch die Induktion der alkalischen Phosphatase Aktivität, Smad1/5/8-Phosphorylierung und der anti-proliferative Effekt in C2C12 Myoblasten untersucht. Die FSAP-induzierte gesteigerte biologische Aktivität der BMPs war durch den BMP-Inhibitor Noggin reversibel. Die FSAP Behandlung von BMP-2 und pro-BMP-2 führte außerdem zu ihrer verstärkten Internalisierung.

Neben Myoblasten reagierten auch VSMCs auf FSAP behandeltes BMP-2 und pro-BMP-2 durch Smad1/5/8 Phosphorylierung sowie Induktion der BMP-VSMC Zielgene Id1 und Smad6. Um die Rolle von endogener FSAP zu ermitteln, wurden Hepatozyten mit FSAP siRNA transfiziert um FSAP herunter zu regulieren, und die BMP-Prozessierung mittels Aktivierung untersucht. Eine Minderung des endogenen FSAP Gehalts führte zu einer Reduktion der BMP-Spaltung und –Aktivität, was sich durch Induktion des hepatischen Zielgens Hepcidin nachweisen lies.

Um die beteiligten Aminosäuren der Wachstumsfaktorspaltung durch FSAP zu ermitteln, wurde eine Mutationsstudie mit pro-BMP-2 durchgeführt. Dafür wurden 5 verschiedene Konstrukte mit je einem Aminosäureaustausch (Arg→Serin) kloniert (K278S, R282S, K285S, R282S, K290S) und in HEK293 Zellen exprimiert. Sowohl die reifen Peptide als auch zu geringerem Anteil ihre latenten Proformen wurden sekretiert. Die Mutationen hatten jedoch keinen Einfluss auf die FSAP induzierte Spaltung. Eine Triple-Mutationsstudie mit den pro-BMP-2 Mutanten SSS²⁸² und der Mutation SSS²⁸⁹ in der reifen BMP-2 Kette ergab, dass nur die SSS²⁸⁹ Variante vor der FSAP Proteolyse geschützt war. Die Mutation der Prodomäne führte zu einer deutlich reduzierten Sekretion.

In dieser Arbeit wurde ein neuer positiver Aktivierungsmechanismus von BMP-2 sowie seiner Proform durch FSAP und Plasmin identifiziert. Daher ist FSAP ein neuer Aktivator von Differenzierungs- und pro-osteogenen Faktoren. Zusammen mit dem Befund, dass FSAP den pro-proliferativen Wachstumsfaktor PDGF-BB inhibiert, vermag FSAP die Proliferation und Differenzierung von vaskulären Zellen zu kontrollieren, und den Phänotyp zur Kalzifizierung voranzutreiben. Diese reziproken Mechanismen könnten die Rolle der FSAP als Risikofaktor in fibroproliferativen und degenerativen Gefäßkrankheiten wie Arteriosklerose und vaskuläre Kalzifizierung erklären.

8 Summary

The Factor VII-activating protease (FSAP) is a circulating serine protease of hepatic origin. The single nucleotide polymorphism (SNP) (G534E) called the „Marburg I“ of the FSAP gene (*HABP2*) can be found in 5% of the western population and is characterized by a decreased enzymatic activity and is associated with various vascular diseases like atherosclerosis, vascular calcification and fibrosis.

Previously results of our group showed that FSAP degrades the cystin knot protein *platelet derived growth factor* (PDGF-BB) resulting in a reduction of vascular smooth muscle cell activation in a mouse model. Because FSAP protein activity has an impact on fibroproliferative and degenerative disease, we addressed the question whether FSAP also regulates members of the structurally related transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily of cystin knot proteins. To analyse this, mature growth factors and their respective latent pro-forms were investigated.

In this work, members of the bone morphogenetic protein (BMP) and growth and differentiation (GDF) family have been identified as new FSAP substrates, which lead to activation of their osteogenic differentiation and anti-proliferative effects. The effect of FSAP treatment of BMP-2, pro-BMP-2 and pro-GDF-5 was analysed by various *in vitro* cellular assays. Amino-terminal sequencing showed cleavage of BMP-2 by FSAP treatment and generation of a truncated peptide (R²⁸⁹-K²⁹⁰), which lacked 7 aminoacids. The latent proform of BMP-2 was further cleaved to the mature form (R²⁸²-Q²⁸³) by FSAP, indicating the same cleavage site as for furin (RXXR). A second cleavage was also observed at the same position as in mature BMP-2. Also the proform of GDF-5 was cleaved and activated by FSAP. The specificity of FSAP induced growth factor activation was further compared with different proteases, indicating that only structurally related plasmin was also an activator. Surprisingly TGF- β -1 was not a candidate for FSAP cleavage.

The biological activity of processed BMP-2 was measured by the induction of alkaline phosphatase activity, increased smad1/5/8 phosphorylation and inhibition of proliferation in C2C12 myoblasts. FSAP had a dose- and time dependent stimulatory effect on BMP-2 activity. FSAP induced BMP-2 activity was abolished after treatment with BMP inhibitor Noggin. Besides osteogenic differentiation, FSAP incubation of BMP-2 and pro-BMP-2 also resulted in their enhanced internalization in C2C12 cells.

VSMCs responded to FSAP treated BMP-2 and pro-BMP-2 by increased smad1/5/8 phosphorylation and induction of the BMP –VSMC target genes Id1 and smad6.

To further estimate the role of endogenous FSAP, hepatocytes were transfected with FSAP siRNA. FSAP-dependent BMP-2 and pro-BMP-2 activation was shown and furthermore activated BMP-2 induced target gene expression in hepatocytes, indicating that endogenous FSAP is the major activator of BMP-2 in hepatocytes.

To elucidate the specific amino acids involved in FSAP-induced growth factor activation, a mutation study of pro-BMP-2 was performed. Therefore 5 different constructs were cloned, with each one bearing a single site mutation (K278S, R282S, K285S, R282S und K290S) and expressed in HEK293 cells. All mutants were secreted as mature form and to lesser extend as proform in the supernatant. Site mutations of 5 different basic amino acids to nonpolar serine residues did not alter FSAP cleavage indicating that the putative cleavage site requires recognition of more than one residue. A triplemutation study with the pro-BMP-2 variant SSS²⁸² and a mutation in the mature BMP-2 chain SSS²⁸⁹ revealed that only the SSS²⁸⁹ variant was protected from FSAP cleavage. There was a dramatically decrease in SSS²⁸² secretion in HEK293 cells.

Here, a new positive regulatory mechanism of the activation of latent and mature BMPs by an extracellular protease has been elucidated. Thus, FSAP is an activator of differentiation- and pro-osteogenic factors. Together with the observation that FSAP induced inhibition of the pro-proliferative PDGF-BB growth factor, FSAP controls proliferation and differentiation of vascular cells favoring a calcification-type phenotype. These reciprocal mechanisms could explain the role of FSAP in fibroproliferative and degenerative vascular diseases like atherosclerosis and vascular calcification.

9 Literatur

- Adiquzel, E.** Ahmad, P.J. Franco, C. Bendeck, M.P. 2009. Collagens in the progression and complications of atherosclerosis. *Vasc Med* 14:73-89
- Ahmad-Nejad, P.** Dempfle, C.E. Weiss, C. Bugert, P. Borggrefe, M. Neumaier, M. 2012. The G534E Polymorphism of the gene encoding the Factor VII-activating protease is a risk factor for venous thrombosis and recurrent events. *Thromb Res* Epub ahead of print
- Alkawa, E.** et al., 2007. Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation* 116: 2841-2850
- Allendorph, G.P.** Vale, W. W. And Choe, S. 2006. Structure of the ternary signalling complex of a TGF- β superfamily member. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 103:7643-7648
- Altincicek, B.** Shibamiya, A. Trusheim, H. Tzima, E. Niepmann, M. Linder, D. Preissner, K.T. Kanse, S.M. 2006. A positively charged cluster in the epidermal growth factor-like domain of factor VII-activating protease (FSAP) is essential for polyanion binding. *Biochem J* 394:687-92
- Amento, E.P.** Ehsani, N. Palmer, H. Libby, P. 1991. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1391-1396
- Ashcroft, G.S.** 1999. Bidirectional regulation of macrophage function of TGF- β . *Microbes Infect* 1:1275-1282
- Avsian-Kretschmer, O.** Hsueh, A.J. 2004. Comparative genomic analysis of the eight-membered ring cysteine knot-containing bone morphogenetic protein antagonists. *Mol Endocrinol* 18:1-12
- Babitt, J.L.** Zhang, Y. Samad, T.A. Xia, Y. Tang, J. Campagna, J.A. et al., 2005. Repulsive guidance molecule (RGMa), a DRAGON homologue, is a bone morphogenetic protein co-receptor. *J Biol Chem* 280:2980-7
- Backes, B.J.** Harris, J.L. Leonetti, F. Craik, C.S. Ellman, J.A. 2000. Synthesis of positional-scanning libraries of fluorogenic peptide substrates to define the extended substrate specificity of plasmin and thrombin. *Nat Biotechnol* 18:187-193
- Barbara, N.P.** Wrana, J.L. Letarte, M. 1999. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signalling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor- β superfamily. *J Biol Chem* 274:584-94
- Basak, A.** Touré BB, Lazure C, Mbikay M, Chrétien M, Seidah NG. 1999. Enzymic characterization in vitro of recombinant proprotein convertase PC4. *Biochem J* 343:29-37.
- Benjamin, I.J.** 2012. Targeting endoglin, an auxiliary TGF-beta coreceptor, to prevent fibrosis and heart failure. *Circulation*. in press
- Bennett, B.J.** Scatena, M. Kirk, E.A. Rattazzi, M. Varon, R.M. Averill, M. Schwartz, S.M. Giachelli, C.M. Rosenfeld, M.E. 2006. Osteoprotegerin inactivation accelerates advanced atherosclerotic lesion progression and calcification in older ApoE $^{-/-}$ mice. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 26:2117-2124
- Bobik, A.** 2006. Transforming growth factor- β s and vascular disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1712-1720
- Boström, K.I.** Rajamannan, N.M. Towler, D.A. 2011. The regulation of valvular and vascular sclerosis by osteogenic morphogens. *Circulation research* 109:564-577
- Brown, M.A.** Zhao, Q. Baker, K.A. Naik, C. Chen, C. Pukac, L. et al., 2005. Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with proregion and receptors. *J Biol Chem* 280:25111-25118
- Burton, D.G.A.** Matsubara, H. Ikeda, K. 2010. Pathophysiology of vascular calcification: pivotal role of cellular senescence in vascular smooth muscle cells. *Experimental*

Gerontology 45:819-824

Casanovas, G. Mleczko-Sanecka K. Altamura, S. Hentze, M.W. Muckenthaler, M.U. 2009. Bone morphogenetic protein (BMP) responsive elements located in the proximal and distal hepcidin ignalli are critical for its response to HJV/BMP/SMAD. *J Mol Med (Berl.)* 87:471-480

Chan, M.C. Nguyen, P.H. Davis, B.N. Ohoka, N. Hayashi, H. Du, K. Lagna, G. Hata, A. 2007. A novel regulatory mechanism of the bone morphogenetic protein (BMP) ignalling pathway involving the carboxyl-terminal tail domain of BMP type II receptor. *Mol Cell Biol* 27:5776-5789

Chen, G. Deng, C. Li, Y.P. 2012. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci* 8:272-288

Choi-Miura NH, Saito K, Takahashi K, Yoda M, Tomita M. 2001. Regulation mechanism of the serine protease activity of plasma hyaluronan binding protein. *Biol Pharm Bull* 24:221-5.

Choi-Miura NH, Takahashi K, Yoda M, Saito K, Mazda T, Tomita M. 2001. Proteolytic activation and inactivation of the serine protease activity of plasma hyaluronan binding protein. *Biol Pharm Bull* 24:448-52.

Choi-Miura, N.H., T. Tobe, J. Sumiya, Y. Nakano, Y. Sano, T. Mazda, and M. Tomita. 1996. Purification and characterization of a novel hyaluronan-binding protein (PHBP) from human plasma: it has three EGF, a kringle and a serine protease domain, similar to hepatocyte growth factor activator. *J Biochem (Tokyo)*. 119:1157-65.

Ciceri, P. Volpi, E. Brenna, I. Arnaboldi, L. Neri, L. Brancaccio, D. Cozzolino, M. 2012. Combined effects of ascorbic acid and phosphate on rat VSMC osteolastic differentiation. *Nephrol Dial Transplant* 27:122-7

Cola, C. Almeida, M. Li, D. Romeo, F. Mehta, J.L. 2004. Regulatory role of endothelium in the expression of genes affecting arterial calcification. *Biochem Biophys Res Commun* 320:424-427

Constam, D.B., and **E.J. Robertson.** 1999. Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *J Cell Biol.* 144:139-49.

Crawford, S.E. Stellmach, V. Murphy-Ullrich, J.E. Ribeiro, S.M. Lawler, J. Hynes, R.O. Boivin, G.P. Bouck, N. 1998. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* 93:1159-1170

Csiszar, A. Ahmad, M. Smith, K.E. Labinsky, N. Gao, Q. Kaley, G. et al., 2006. Bone morphogenetic protein-2 induces proinflammatory endothelial phenotype. *Am J Pathol* 168:629-38

Csiszar, A. Labinsky, N. Jo, H. Ballabh, P. Ungvari, Z. 2008. Differential proinflammatory and prooxidant effects of bone morphogenetic protein-4 in coronary and pulmonary arterial endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295:H569-77

Csiszar, A. Smith, K.E. Koller, A. Kaley, G. Edwards, J.G. Ungvari, Z. 2005. Regulation of Bone morphogenetic protein-2 expression in endothelial cells: role of nuclear factor-kappaB activation by tumor necrosis factor-alpha, H2O2 and high intravascular pressure. *Circulation* 111:2364-72

Cui, Y, Jean, F. Thomas, G. Christian, J.L. 1998. BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *EMBO J* 17 :4735-4743

Cui, Y. Hackenmiller, R. Berg, L. Jean, F. Nakayama, T. Thomas, G. Christian, J.L. 2001. The activity and signaling range of mature BMP-4 is regulated by sequential cleavage at two sites within the prodomain of the precursor. *Genes Dev* 15:2797-2802

Daly, N.L. and Craik, D.J. 2011. Bioactive Cysteine knot proteins. *Curr Opin Chem Biol* 15:362-8

Daniel, J.M. Sedding, D.G. 2011. Circulating smooth muscle cells in arterial remodeling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 50:273-279

- David, L.** Mallet, C. Keramidas, M. Lamande, N. Gasc, J.M. Dupuis-Girod, S. et al., 2008. Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular signalling factor. *Circ Res* 102:914-22
- De Crescenzo, G.** Grothe, S. Zwaagstra, J. Tsang, M. O'Connor-McCourt, M.D. 2001. Real-time monitoring of the interactions of transforming growth factor- β (TGF- β) isoforms with latency-associated protein and the ectodomains of the TGF- β type II and III receptors reveals different kinetic models and stoichiometries of binding. *J Biol Chem* 276:29632-29643
- De Stefano, D.** Nicolaus, G. Maiuri, M.C. et al., 2009. NF κ B blockade upregulates Bx, TSP-1, and TSP-2 expression in rat granulation tissue. *Journal of Molecular Medicine* 87:481-492
- Degnin, C.** Jean, F. Thomas, G. Christian, J.L. 2004. Cleavage within in the prodomain direct intracellular trafficking and degradation of mature bone morphogenetic protein-4. *Mol Biol Cell* 15:5012-5020
- Demer, L. and Tintut, Y.** 2011. The roles of lipid oxidation products and receptor activator of nuclear factor- κ B signaling in atherosclerotic calcification. *Circ Res* 108:1392-1412
- Derwall, M.** Malhotra, R. Lai, C.S. Beppu, Y. Aikawa, E. Seehra, J.S. Zapol, W.M. Bloch, K.D. Yu, P.B. 2012. Inhibition of bone morphogenetic protein signalling reduces vascular calcification and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:613-622
- Derynck, R. and Miyazono, K.** 2007. The TGF- β family. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*
- Derynck, R. and Zhang, Y.E.** 2003. Smad dependent and smad independent pathways in TGFbeta family signalling. *Nature* 425:577-584
- Dhore, C.R.** Cleutjens, J.P. Lutgens, E. Cleutjens, K.B. Geusens, P.P Kitslaar, P.J. Tordoir, J.H. Spronk, H.M. Vermeer, C. and Daemen, M.J. 2001. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1998-2003
- di Clemente, N.** Jamin, S.P. Lugovskoy, A. Carmillo, P. Ehrenfels, C. Picard, J.Y. Whitty, A. Josso, N. Pepinsky, R.B. Cate, R.L. 2010. Processing of anti-mullerian hormone regulates receptor activation by a mechanism distinct from TGF-beta. *Mol Endocrinol* 24:2193-206
- Dionne, M.S.** Skarnes, W.C. Harland, R.M. 2001. Mutation and analysis of Dan, the founding member of the dan family of transforming growth factor β antagonists. *Mol Cell Biol* 21:636-643
- Donahue, M.** 2011. Acute respiratory distress syndrome: a clinical review. *Pulmonary Circulation* 1:192-211
- Dong, L.H.** Wen, J.K. Miao, S.B. Jia, Z. Hu, H.J. Sun, R.H. Wu, Y. Han, M. 2010. Baicalin inhibits PDGF-BB-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation through suppressing PDGFR β -ERK signalling and increase in p27 accumulation and prevents injury-induced neointimal hyperplasia. *Cell Res* 21:1276
- Donghyun Lee** 2011. Vascular Calcification: Inducers and inhibitors. *Materials Science and Engineering B* 176:1133-1141
- Dubois, C.M.** Laprise, M.H. Blanchette, F. Gentry, L.E. Leduc, R. 1995. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* 270:10618-10624
- Dzau, V.J.** Braun-Dullaeus, R.C. Sedding, D.G. 2002. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med* 8:1249-56
- Essalmani, R.** Zaid, A. Marcinkiewicz, J. Chamberland, A. Pasquato, A. Seidah, N.G. Prat, A. 2008. In vivo functions of the proprotein convertase PC5/6 during mouse development: Gdf11 is a likely substrate. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 105:5750-5755
- Etscheid, M.** Beer, N. Dodt, J. 2005. The hyaluronan-binding protease upregulates ERK1/2

- and PI3K/Akt signalling in fibroblasts and stimulates cell proliferation and migration. *Cell Signal* 17:1486-94
- Etscheid, M.** Beer, N. Kreß, J.A. Seitz, R. Dodt, J. 2004. Inhibition of bFGF/EGF-dependent endothelial cell proliferation by the hyaluronan-binding protease from human plasma. *Eur J Cell Biol* 82:597-604
- Etscheid, M.** Kreß, J. Seitz, R. Dodt, J. 2008. The hyaluronic acid-binding protease: A novel vascular and inflammatory mediator? *International Immunopharmacology* 8:166-170
- Etscheid, M.,** A. Hunfeld, H. König, R. Seitz, and J. Dodt. 2000. Activation of proPHBSP, the zymogen of a plasma hyaluronan binding serine protease, by an intermolecular autocatalytic mechanism. *Biol Chem.* 381:1223-31.
- Fadini, G.P. and Tjwa, M.** 2010. A role of TGF-beta in transforming endothelial progenitor cells into neointimal smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 211:32-35
- Felin, J.E.** Mayo, J.L. Loos, T.J. Jensen, J.D. Sperry, D.K. Gaufin, S.L. Meinhart, C.A. Moss, J.B. Bridgewater, L.C. 2010. Nuclear variants of bone morphogenetic proteins. *BMC Cell Biol* 11(20):1-14
- Felton, C.V.** Crook, D. Davies, M.J. Oliver, M.F. 1997. Relation of plaque lipid, composition and morphology to the stability of human aortic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:1337-45
- Foletta, V.C.** Lim, M.A. Soosairajah, J. Kelly, A.P. Stanley, E.G. Shannon, M. He, W. Das, S. Massague, J. Bernard, O. 2003. Direct signalling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1. *J Cell Biol* 162:1089-1098
- Francis-West, P.H.** Abdelfattah, A. Chen, P. Allen, C. Parish, J. Ladher, R. Allen, S. MacPherson, S. Luyten, F.P. Archer, C.W. 1999. Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development. *Development* 126:1305-1315
- Fritsch, C.** Sawala, A. Harris, R. Maartens, A. Sutcliffe, C. Ashe, H.L. Robert, P.R. 2012. Different requirements for proteolytic processing of bone morphogenetic protein 5/6/7/8 ligands in Drosophila Melanogaster. *J Biol Chem* 287:5942-5953
- Fujisawa, T.** Huang, Y. Sebald, W. Zhang, J.L. 2009. The binding of von Willebrand factor type C domains of chordin family proteins to BMP-2 and Tsg is mediated by their SD1 subdomain. *Biochem Biophys Res Commun* 385:215-9
- Gardener, H.** Beecham, A. Cabral, D. Yanuck, D. Slifer, S. Wang, L. Blanton, S.H. Sacco, R.L. Juo, S.-H.H. Rundek, T. 2011. Carotid plaque and candidate genes related to inflammation and endothelial function in Hispanics from northern Manhattan. *Stroke* 42:889-896
- Gautschi, O.P.** Cadosh, D. Zellweger, R. Joesbury, K.A. Filqueira, L. 2009. Apoptosis induction and reduced proliferation in human osteoblasts by rhBMP-2, -4 and -7. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 9:53-60
- Ge, G. and Greespan, D.S.** 2006. BMP-1 controls TGFbeta1 activation via cleavage of latent TGFbeta-binding protein. *J Cell Biol* 175:111-120.
- George, S.J.** Johnson, J.L. Smith, M.A. Angelini, G.D. Jackson, C.L. 2005. Transforming growth factor beta is activated by plasmin and inhibits smooth muscle cell death in human saphenous vein. *J Vasc Res* 42:247-54
- Giachelli, C.M.** 2004. Vascular calcification mechanisms. *J Am Soc Nephrol* 15:2959-2964
- Giachelli, C.M.** Speer, M.Y. Li, X.L. Rajachar, R.M. Yang, H. 2005. Regulation of vascular calcification: Roles of phosphate and osteopontin. *Circ Res* 96:714-722
- Gkouvastso, K.** Papanikolaou, Pantapoulos, K. 2011. Regulation of iron transport and the role of signalling 37 °C. *Biochim Biophys Acta* doi:10.1016/j.bbagen.2011.10.013
- Gorene, I.** Kavurma, M. Scott, S. Bennett, M. 2006. Vascular smooth muscle cell senescence in atherosclerosis. *Cardiovascular Research* 72:9-17
- Grainger, D.J.** Wakefield, L. Bethell, H.W. et al., 1995. Release and activation of platelet latent TGF-β in blood clots during dissolution with plasmin. *Nat med* 1:932-7

- Gray, K. and Ellis, V.** 2008. Activation of pro-BDNF by the pericellular serine protease plasmin. *FEBS Letters* 582:907-910
- Gregory, K.E.** Ono, R.N. Charbonneau, N.L. Kuo, C.L. Keene, D.R. Bachinger, H.P. and Sakai, L.Y. 2005. The prodomain of BMP-7 targets the BMP-7 complex to the extracellular matrix. *J Biol Chem* 280:27970-27980
- Groppe, J.** Greenwald, J. Wiater, E. Rodriguez-Leon, J. Economides, A.N. Kwialkowski, W. Baban, K. Affolter, M. Vale, W.W. Izpiusa Belmonte, J.C. Choe, S. 2003. Structural basis of BMP signalling inhibition of Noggin, a novel twelve-membered Cysteine knot protein. *J Bone Jt Surg Am* 85(Suppl.3):52-58
- Gulesserian, T.** Hron, G. Endler, G. et al., 2006. Marburg I polymorphism of factor VII activating protease and risk of recurrent venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 95:65-67
- Guo, J. and Wu, G.** 2012. The signalling and functions of heterodimeric bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 23:61-7
- Halbrooks, P.J.** Ding, R. Wozney, J.M. Bain, G. 2007. Role of RGM coreceptors in bone morphogenetic protein signalling. *J Mol Signal* 3:4
- Hanson, E.** Kanse, S.M. Joshi, A. Jood, A. Nilsson, S. Blomstrand, C. Jern, C. 2012. Plasma factor VII activating protease antigen levels and activity are increased in ischemic stroke. *J Thromb Haemost* 10:848-56
- Hansson, G.K.** Robertson, A.K. Sonderberg-Naucler, C. 2006. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol* 1:297-329
- Harrison, C.A.** Al-Musawi, S.L. Walton, K.L. 2011. Prodomains regulate the synthesis, extracellular localisation and activity of TGF- β superfamily ligands. *Growth Factors* 29:174-186
- Hartung, A.** Bitton-Worms, K. Rechtman, M.M. Wenzel, V. Borgermann, J.H. Hassel, S. Henis, Y.I. Knaus, P. 2006. Different routes of bone morphogenetic protein (BMP) receptor endocytosis influence BMP signalling. *Mol Cell Biol* 26:7791-7805
- Hauburger, A., S.** von Einem, G.K. Schwaerzer, A. Buttstedt, M. Zebisch, M. Schraml, P. Hortschansky, P. Knaus, and E. Schwarz. 2009. The pro-Form of BMP-2 interferes with BMP-2 signalling by competing with BMP-2 for IA receptor binding. *Febs J.* 276:6386-98.
- Hayashi, H.** Sakai, K. Baba, H. Sakai, T. 2012. Thrombospondin-1 is a novel negative regulator of liver regeneration after partial hepatectomy via TGF- β 1 activation in mice. *Hepatology* in press
- Helbing, T.** Rothweiler, R. Ketterer, E. Goetz, L. Heinke, Grundmann, S. Duerschmied, D. Patterson, C. Bode, C. Moser, M. 2011. BMP activity controlled by BMPER regulates the proinflammatory phenotype of endothelium. *Blood* 118:5040-9
- Heldin, P.** Pertoft, H. Nordlin, H. Heldin, C.H. Laurent, T.C. 1991. Differential expression of platelet-derived growth factor alpha- and beta-receptors on fat-storing cells and endothelial cells of rat liver. *Exp Cell Res* 193:346-9
- Heng, S.** Paule, S. Hardman, B. Li, Y. Singh, H. Rainczuk, A. Stephens, A.N. Nie, G. 2010. Posttranslational activation of bone morphogenetic protein 2 is mediated by proprotein convertase 6 during decidualization for pregnancy establishment. *Endocrinology* 151:3909-3917
- Hillger, F.** Herr, G. Rudolph, R. Schwarz, E. 2005. Biophysical comparison of BMP-2, pro-BMP-2, and the free pro-peptide reveals stabilization of the pro-peptide by the mature growth factor. *J Biol Chem* 280:14974-14980
- Hogan, B.L.** 1996. Bone morphogenetic proteins: Multifunctional of vertebrate development. *Genes Dev* 10:1580-94
- Hopkins, D.R.** Keles, S. Greenspan, D.S. 2007. The bone morphogenetic protein 1/Tolloid-like metalloproteinases. *Matrix Biol* 26:508-523
- Hoppe, B.** Tolou, F. Dorner, T. et al., 2006. Gene polymorphisms implicated in influencing

susceptibility to venous and arterial thromboembolism: frequency distribution in a healthy German population. *Thromb Haemost.* 96 :465-470.

Horbelt, D. Denkis, A. Knaus, P. 2012. A portrait of transforming growth factor β superfamily signalling: Background matters. *Int J Biochem Cell Biol* 44:469-74

Hruska, K.A. Mathew, S. Saab, G. 2005. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circ Res* 97:105-114

Huang, W. Yang, S. Shao, J. Li, Y.P. 2007. Signaling and transcriptional regulation of osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci* 12:3068-92

Hurst, J.N. Najy, A.J. Ustach, C.V. Movilla, L. Choi-Kim, H.R. 2012. Platelet-derived growth factor-C (PDGF-C) activation by serine proteases: implications for breast cancer progression. *Biochem J.* 441:909-918

Hye-Ryong Shim, A. Liu, H. Focia, P.J. Chen, X. Lin, C. He, X. 2010. Structures of a platelet-derived growth factor/ propeptide complex and a platelet-derived growth factor/ receptor complex. *PNAS* 107:11307-11312

Ibanez, C.F. 2002. *Trends Neurosci* 25:284-286

Ikemura, H. Takagi, H. Inouye, M. 1987. Requirement of pro-sequence for the production of active subtilisin E in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 262:7859-7864

Innasimuthu, A.L. and **Katz, W.E.** 2011. Effect of bisphosphonates on the progression of degenerative aortic stenosis. *Echocardiography* 28:1-7

Innis, C.A. Shi, J. and Blundell, T.L. 2000. Evolutionary trace analysis of TGF- β and related growth factors: implications for site-directed mutagenesis. *Protein Eng* 13:839-847

Inoue, K. Mikuni-Takagaki, Y. Oikawa, K. Itoh, T. Inada, M. et al., 2006. A crucial role for matrix metalloproteinase 2 in osteocytic canalicular formation and bone metabolism. *J Biol Chem* 281:33814-33824

Ireland, H. Miller, G.J. Webb, K.E. et al., 2004. The factor VII activating protease G511E (Marburg) variant and cardiovascular risk. *Thromb Haemost.* 92:986-992.

Irie, A. Habuchi, H. Kimata, K. Sanai, Y. 2003. Heparan sulfate is required for bone morphogenetic protein-7 signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 308:858-65

Irvine, S.A. Foka, P. Rogers, S.A. Mead, J.R. Ramji, D.P. 2005. A critical role for the Ap-1 binding sites in the transforming growth factor-mediated inhibition of lipoprotein lipase gene expression in macrophages. *Nucleic Acid Res* 33:1423-1434

Israel, D.I. et al., 1996. *Growth Factors* 13(3-4)291

Israel, D.I. Nove, J. Kerns, K.M. Moutsatsos I.K. Kaufmann, R.J. 1992. Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells. *Growth Factors* 7:139-150

Jadrich, J.L. O'Connor, M.B. Coucouvanis, E. 2006. The TGF- β activated kinase TAK1 regulates vascular development in vivo. *Development* 133:1529-1541

Jenkins, G. 2008. The role of proteases in transforming growth factor-beta activation. *Int J Biochem Cell Biol* 40:1068-1078

Jeon, J.W., H.S. Song, E.J. Moon, S.Y. Park, M.J. Son, S.Y. Jung, J.T. Kim, D.H. Nam, N.H. Choi-Miura, K.W. Kim, and Y.J. Kim. 2006. Anti-angiogenic action of plasma hyaluronan binding protein in human umbilical vein endothelial cells. *Int J Oncol.* 29:209-15.

Jiao, X. Billings, P.C. O'Connell, M.P. Kaplan, F.S. Shore, E.M. Glaser, D.L. 2007. Heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) modulate BMP2 osteogenic bioactivity in C2C12 cells. *J Biol Chem* 282:1080-1086

Jin, W. Yun, C. Kim, H.S. Kim, S.J. 2007. TrkC binds to the bone morphogenetic protein type II receptor to initiate bone morphogenetic protein signalling. *Cancer Res* 67:9869-77

Johnson, R.C. Leopold, J.A. Loscalzo, J. 2006. Pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res* 99:1044-1059

Kado, D.M. et al., 2000. Rate of bone loss is associated with mortality in older women: a

prospective study. *J Bone Miner Res* 15:1974-1980

Kannemeier, C., A. Feussner, H.A. Stohr, J. Weisse, K.T. Preissner, and J. Romisch. 2001. Factor VII and single-chain plasminogen activator-activating protease: activation and autoactivation of the proenzyme. *Eur J Biochem*. 268:3789-96.

Kannemeier, C., N. Al-Fakhri, K.T. Preissner, and S.M. Kanse. 2004. Factor VII activating protease (FSAP) inhibits growth factor-mediated cell proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Faseb J*. 18:728-30.

Kanse, S.M. Declerck, P.J. Ruf, W. Bronze, G. Etscheid, M. 2011. Factor VII activating protease (FSAP) promotes the proteolysis and inhibition of tissue factor pathway inhibitor (TFPI). In revision

Kanse, S.M. Gallenmüller, A. Zeerleder, S. Stephan, F. Rannou, O. Denk, S. Etscheid, M. Lochnit, G. Krüger, M. Huber-Lang, M. 2012. Factor VII-activating protease is activated in multiple trauma patients and generates anaphylatoxin C5a. *J Immunol* 188:2858-2865

Kanse, S.M. Linn, T. Sürücü, O. Matz, R. Henning, S. Dietz, C. et al, 2006. Factor VII activating protease inhibits angiogenesis in vivo. *Hämostaseologie* 1:62

Kanzaki, S. Ariyoshi, W. Takahashi, T. Okinaga, T. Kaneuji, T. Mitsugi, S. Nakashima, Tsujisawa, T. Nishihara, T. 2011. Dual effects of heparin on BMP-2 induced osteogenic activity in MC3T3-E1 cells. *Pharmacological reports* 63:1222-1230

Kanzaki, S. Takahashi, T. Kanno, W. Ariyoshi, K. Shinmyozu, T. Tujisawa, Nishiara, T. 2008. Heparin inhibits BMP-2 osteogenic bioactivity by binding to both BMP-2 and BMP receptor. *J Cell Physiol* 216:844-50

Kardassis, D. Murphy, C. Fotsis, T. Moustakas, A. Stournaras, C. 2009. Control of transforming growth factor beta signal transduction and by small GTPases. *FEBS J* 276:2947-2965

Karwowski W. Naumnik B, Szczepański M, Myśliwiec M. 2012. The mechanism of vascular calcification - a systematic review. *Med Sci Monit* 18:RA1-11.

Kasten, P. Beyen, I. Bormann, D. Luginbühl, R. Plöger, F. Richter, W. 2010. The effect of two point mutations in GDF-5 on ectopic bone formation in a beta-tricalciumphosphate scaffold. *Biomaterials* 31:3878-84

Katagiri, T. Imada, M. Yanai, T. Suda, T. Takahashi, N. Kamijo, R. 2002. Identification of a BMP-responsive element in Id1, the gene for inhibition of myogenesis. *Genes Cell* 7:949-60

Katagiri, T. Yamaguchi, A. Komaki, M. Abe, E. Takahashi, N. Ikeda, T. Rosen, V. Wozney, J.M. Fujisawa-Sehara, A. and Suda, T. 1994. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol*. 127:1755-66

Kelley, R. Ren, R. Pi, X. Wu, Y. Moreno, I. Willis, M. Moser, M. Ross, M. Podkowa, M. Attisano, L. Patterson, C. 2009. A concentration-dependent endocytic trap and sink mechanism converts BMPER from an activator to an inhibitor of BMP signalling. *J Cell Biol* 184:597-609

Kiel, D.P. Kauppila, L.I. Cupples, L.A. Hannan, M.T. O'Donnell, C.J. Wilson, P.W. 2001. Bone loss and the progression of abdominal aortic calcification over a 25 year period: The Framingham Heart Study. *Calcif Tissue Int* 68:271-276

Kirsch, T. Sebald, W. Dreyer, M.K. 2000. Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex. *Nat Struct Biol* 7:492-6

König, W. and **Khuseynova, N.** 2007. Biomarkers of atherosclerotic plaques instability and rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:15-26

Kress, J.A. Seitz, R. Dodt, J. Etscheid, M. 2006. Induction of intracellular signalling in human endothelial cells by the hyaluronan-binding protease involves two distinct pathways. *Biol Chem* 387:1275-83

Künnapu, J. Björkgreen, I. and Shimmi, O. 2009. The drosophila DPP signal is produced

- by cleavage of its proprotein at evolutionary diversified furin-recognition sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:8501-8505
- Kuwahara, K.** Fang, J.Y. Yang, Z. Han, B. 2011. Enzymatic crosslinking and degradation of gelatin as a switch for bone morphogenetic protein-2 activity. *Tissue Eng Part A* 17:23-24
- Langenfeld, E.M. and Langenfeld, J.** 2004. Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors. *Mol Cancer Res* 2:141-149
- Leboy, P.S.** Grasso-Knight, G. D'Angelo, M. Volk, S.W. Lian, J.B. Drissi, H. Stein, G.S. Adams, S.L. 2001. Smad-Runx2 interactions during chondrocyte maturation. *J Bone Joint Surg Am* 83:S15-S22
- Lee, R.** Kermani, P. Teng, K.K. Hempstead, B.L. 2001. *Science* 294:1945-1948
- Lee, S.J. and McPherron, A.C.** 2001. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9306-11
- Lee-Hoeflich, S.T.** Causing, C.G. Podkowa, M. Zhao, X. Wrana, J.L. and Attisano, L. 2004. Activation of LIMK1 by binding to the BMP receptor, BMPRII, regulates BMP-dependent dendritogenesis. *EMBO J* 23:4792-4801
- Leighton, M. and Kadler, K.E.** 2003. Paired basic/furin-like proprotein convertase cleavage of pro-BMP-1 in the trans-golgi network. *J Biol Chem* 278:18578-18484
- Li, S.** Shimono, C. Norioka, N. Nakano, I. Okubo, T. Yagi, Y. Hayashi, M. Sato, Y. Fujisaki, H. Hattori, S. Sugiura, N. Kimata, K. Sekiguchi, K. 2010. Activin A binds to perlecan through its pro-region that has heparin/heparan sulfate binding activity. *J Biol Chem* 285:36645-55.
- Li, X. Giachelli, C.M.** 2004. The role of type III sodium-dependent phosphate cotransporter Pit-1 in smooth muscle cell calcification. *Cardiovasc Pathol* 13:(Suppl 1):185
- Libby, P.** Ridker, P.M. Hansson, G.K. 2011. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473:317-325
- Lindahl, A.K.** 1997. Tissue factor pathway inhibitor: from unknown coagulation inhibitor to major antithrombotic principle. *Cardiovasc Res* 33:286-91
- Little, SC. and Mullins, MC.** 2009. Bone morphogenetic protein heterodimers assemble heteromeric type I receptor complexes to pattern the dorsoventral axis. *Nat Cell Biol* 11:637-43
- Lopez-Dee, Z.** Pidcock, K. Gutierrez, L.S. 2011. Thrombospondin-1: multiple paths to inflammation. *Mediators of Inflammation* doi :10.1155/2011/296069
- Lopez-Rovira, Chalaux, E.** Massague, Rosa, J.L. Ventura, F. Direct binding of Smad1 and Smad4 to two distinct motifs mediates bone morphogenetic protein-specific transcriptional activation of Id1 gene. *J Biol Chem* 279:3176-3185
- Lories, R.J.U.** Derese, I. Ceuppens, J.L. Luyten, F.P. 2003. Bone morphogenetic proteins 2 and 6, expressed in arthritic synovium, are regulated by proinflammatory cytokines and differentially modulate fibroblast-like synoviocyte apoptosis. *Arthritis & Rheumatism* 48:2807-2818
- Lyon M,** Rushton G, Gallagher JT. 1997. The interaction of the transforming growth factor-betas with heparin/heparan sulfate is isoform-specific. *J Biol Chem.* 272:18000-6.
- Maeda Y,** Tsuji K, Nifuji A, Noda M. 2004. Inhibitory helix-loop-helix transcription factors Id1/Id3 promote bone formation in vivo. *J Cell Biochem* 93:337-44.
- Mahoney, D.J.** Mikecz, K. Ali, T. Mabileau, G. Benayahu, D. Plaas, A. Milner, C.M. Day, A.J. Sabokbar, A. 2008. TSG-6 regulates bone signalling through inhibition of osteoblastogenesis and osteoclast activation. *J Biol Chem* 283:25952-62
- Makanji, Y.** Walton, K.L. Chan, K.L. Gregorevic, P. Robertson, D.M. Harrison, C.A. 2011. Generation of a specific activin antagonist by modification of the activin A propeptide. *Endocrinology* 152:3758-68
- Mallat, Z.** Gojova, A. Marchiol-Fournigault, C. Esposito, B. Kamate, C. Merval, R.

- Fradelizi, D. Tedgui, A. 2001. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaques phenotype in mice. *Circ Res* 89:930-934
- Mambetsariev N**, Mirzapioazova T, Mambetsariev B, Sammani S, Lennon FE, Garcia JG, Singleton PA. 2010. Hyaluronic Acid binding protein 2 is a novel regulator of vascular integrity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.30:483-90
- Martinez-Barbera, J.P.** Toresson, H. Da Rocha, S. Knaus, S. 1997. Cloning and expression of three members of the zebrafish Bmp family: Bmp2a, Bmp2b and Bmp4. *Gene* 198:53-9
- Massague, J. Weis-Garcia, F.** 1996. Serine/ threonine kinase receptors: Mediators of transforming growth factor beta family signals. *Cancer Surv* 27:41-64
- Massberg, S.** et al., 2002. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med* 196:887-96
- Matsuzaki, K.** Udagawa, N. Takahashi, N. Yamaguchi, K. Yasuda, H. Shima, N. Morinaga, T. Toyama, Y. Yabe, Higashio, K. Suda, T. 1998. Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoklast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 246:199-204
- Mayer, G.** Hamelin, J. Asselin, M.C. Pasquato, A. Marcinkiewicz, E. Tang, M. Tabibzadeh, S. Seidah, N.G. 2008. *J Biol Chem* 283:2373-2384
- McVey, J.H.** 2012. FSAP: Does it do what it says on the tin? *J Thromb Haemost* doi:10.1111/j.1538-7836.2012.04682.x
- Miya, T.** Morita, K. Suzuki, A. Ueno, N. Satoh, N. 1997. Functional analysis of an ascidian homologue of vertebrate Bmp-2/Bmp-4 suggests its role in the inhibition of neural fate specification. *Development* 124:5149-59
- Miyazono, K.** 2009. Transforming growth factor –beta signalling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Sci* 85:314-23
- Miyazono, K. and Miyazawa, K.** 2002. Id: a target of BMP signalling. *Sci STKE* 2002, PE40
- Molloy, S.S.** Thomas, L. VanSlyke, J.K. Stenberg, P.E. Thomas, G. 1994. Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. *EMBO J* 13:18-33
- Moustakas, A. and Heldin, C.H.** 2005. Non-Smad TGF-beta signaling. *J Cell Sci* 15:3573-84
- Moustakas, A. and Heldin, C.H.** 2009. The regulation of TGFβ signal transduction. *Development* 136:3699-3714
- Muhl, L.** Galuska, S.P. Öörni, K. Hernandez-Ruiz, L. Andrei-Selmer, L.C. Geyer, R. Preissner, K.T. Ruiz, F.A. Kovanen, P.T. Kanse, S.M. 2009. High negative charge-to-size ratio in polyphosphates and heparin regulates factor VII-activating protease. *FEBS J* 276:4828-39
- Muhl, L.** Hersemeyer, K. Preissner, K.T. Weimer, T. Kanse, S.M. 2009. Structure-function analysis of factor VII activating protease (FSAP): sequence determinants for heparin binding and cellular functions. *FEBS Lett.* 583:1994-8
- Muhl, L., A.** Nykjaer, M. Wygrecka, D. Monard, K.T. Preissner, and S.M. Kanse. 2007. Inhibition of PDGF-BB by Factor VII-activating protease (FSAP) is neutralized by protease nexin-1, and the FSAP-inhibitor complexes are internalized via LRP. *Biochem J.* 404:191-6.
- Murray-Rust, J.** McDonald, N.Q. Blundell, T.L. Hosang, M. Oefner, C. Winkler, F. Bradshaw, R.A. 1993. Topological similarities in TGF-β 2, PDGF-bb and NGF define a superfamily of polypeptide growth factors. *Structure* 1:153-159
- Müller, T.D. and Nickel, J.** 2012. Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. *FEBS Letters* 586:1846-1859
- Nakagawa, T.** Hosaka, M. Nakayama, K. 1993. Identification of an isoform with an

extremely large Cys-rich region of PC6, a kex2-like processing endoprotease. *FEBS Lett* 327:165-171

Nakagawa, Y. Ikeda, Akakabe, Y. Koide, M. Uraoka, M. Yutaka, K.T. Kurimoto-Nakano, R. Takahashi, T. Matoba, S. Yamada, H. Okigaki, M. Matsubara, H. 2010. Paracrine osteogenic signals via bone morphogenetic protein-2 accelerate the atherosclerotic intimal calcification in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:1908-1915

Nakaoka, T., K. Gonda, T. Ogita, Y. Otawara-Hamamoto, F. Okabe, Y. Kira, K. Harii, K. Miyazono, Y. Takuwa, and T. Fujita. 1997. Inhibition of rat vascular smooth muscle proliferation in vitro and in vivo by bone morphogenetic protein-2. *J Clin Invest.* 100:2824-32.

Nakashima, Y. Raines, E.W. Plump, A.S. Breslow, J.L. Ross, R. 1998. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:842-51

Nakayama, K. 1997. Furin: a mammalian subtilisin/ Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem J* 327:625-635

Nakazawa, F., C. Kannemeier, A. Shibamiya, Y. Song, E. Tzima, U. Schubert, T. Koyama, M. Niepmann, H. Trusheim, B. Engelmann, and K.T. Preissner. 2005. Extracellular RNA is a natural cofactor for the (auto-)activation of Factor VII-activating protease (FSAP). *Biochem J.* 385:831-8.

Nelsen, S.M. and Christian, J.L. 2009. Site-specific cleavage of BMP-4 by furin, PC6, and PC7. *J Biol Chem* 284:27157-27166

Newfeld, S.J. Padgett, R.W. Findley, S.D. Richter, B.G. Sanicola, M. de Cuevas, M. Gelbart, W.M. 1997. Molecular evolution at the decapentaplegic locus in *Drosophila*. *Genetics* 145:297-309

Nickel, J. Dreyer, M.K. Kirsch, T. Sebald, W. 2001. The crystal structure of of the BMP2:BMPR-IA complex and the generation of BMP-2 antagonists. *J Bone Joint Surg Am* 83:57-14

Nitta, K. 2011. Vascular calcification in patients with chronic kidney disease. *Therapeutic Apheresis and Dialysis* 15:513-521

Nohe, A. et al., 2004. *Cell Signal* 16(3)291

Norton, J.D. 2000. ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 13(22):3897-905

Ohkawara, B. Iemura, S. ten Dijke, P. Ueno, N. 2002. Action range of BMP is defined by its N-terminal basic amino acid core. *Curr Biol* 12:205-209

Onichtchouk, D. Chen, Y. G. Dosch, R. Gawantka, V. Delius, H. Massague, J. et al., 1999. Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* 401:480-5

Osako, M.K. Nakagami, H. Koibuchi, N. Shimizu, H. Nakagami, F. Koriyama, H. Shimamura, M. Miyake, T. Rakugi, H. Morishita, R. 2010. Estrogen inhibits vascular calcification via vascular RANKL system. *Circ Res* 107:466-475

Ossareh, S. 2011. Vascular calcification in chronic kidney disease: mechanisms and clinical implications. *Iran J Kidney Dis* 5:285-99

Ossovskaya, V.S. Bunnett, N.W. 2004. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* 84:579-621

Owens, G.K. Kumar, M.S. Wamhoff, B.R. 2004. Molecular recognition of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 84:767-801

Panizo, S. Cardus, A. Encinas, M. Parisi, E. Valcheva, P. Lopez-Ongil, S. Coll, B. Fernandez, E. Valdivielso, J.M. 2009. RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. *Circ Res* 104:1041-1048

Panousis, C.G. Evans, G. Zuckerman, S.H. 2001. TGF- β increases cholesterol efflux and ABC-1 expression in macrophage-derived foam cells: opposing the effects of IFN- γ . *J Lipid Res* 42:856-863

- Parahuleva, M.S.** Hölschermann, H. Erdogan, A. Langanke, E. Prickartz, I. Parviz, Behnouth, Weiskirchen, R. Tillmanns, H. Kanse, S.M. 2010. Factor seven activating protease (FSAP) levels during normal pregnancy and in woman using oral contraceptives. *J Throm Res* 126:e36-e40
- Parahuleva, M.S.** Kanse, S.M. Parviz, B. Barth, A. Tillmanns, H. Bohle, R.M. Sedding, D.G. Hölschermann, H. 2008. Factor seven activating protease (FSAP) expression in human monocytes and accumulation in unstable coronary atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 196:164-71
- Peng, H.** Chen, ST. Wergedal, JE. Polo, JM. Yee, JK. Lau, W. Baylink, D.L. 2001. Development of an mfg-based retroviral vector system for secretion of high levels of functionally active human BMP4. *Molecular Therapy* 4:95-104
- Pennings, M.** Meurs, I. Ye, D. Out, R. Hoekstra, M. Van Berkel, T.J. Van Eck, M. 2006. Regulation of cholesterol homeostasis in macrophages and consequences for atherosclerotic lesion development. *FEBS Lett* 580:5588-96
- Persy, V. and D'Haese, P.** 2009. Vascular calcification and bone disease: the calcification paradox. *Trends in Molecular Medicine* 15:405-416
- Piccolo, S.** Agius, E. Leyns, L. Bhattacharyya, S. Grunz, H. Bouwmeesler, T, De Robertis, E.M. 1999. The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* 397:707-710
- Plöger, F.** Seeman, P. Schmidt-von Kegler, M. Lehman, K. Seidel, J. Kjaer, K.W. Pohl, J. Mundlos, S. 2008. Brachydactyl type A2 associated with a defect in pro-GDF-5 processing. *Human Molecular Genetics* 17:1222-1233
- Rattenholl, A.** Ruoppolo, M. Flagiello, A. Monti, M. Vinci, F. Marino, G. Lilie, H. Schwarz, E. Rudolph, R. 2001. Pro-sequence assisted folding and disulfide bond formation of human nerve growth factor. *J Mol Biol* 305:523-533
- Rawadi, G.** Vayassiere, B. Dunn, F. Baron, R. Roman-Roman, S. 2003. *J Miner Res* 18:1842-1853
- Reddi, A.H.** 1998. Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens. *Nat Biotechnol* 16:247-252
- Reddi, A.H.** 1998. Role of bone morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* 16:247-252
- Remacle, A.G.** Shiryaev, S.A. Oh, E.S. Cieplak, P. Srinivasan, A. Wie, G. Liddington, R.C. Ratnikov, B.I. Day, R. Smith, J.W. et al., 2008. Substrate cleavage analysis of furin and related proprotein convertases: a comparative study. *J Biol Chem* 283:20897-20906
- Reynolds, J.L.** Skepper, J.N. McNair, R. Kasama, T. Gupta, K. Weisberg, P.L. Jahnent-Dechent, W. Shanahan, C.M. 2005. Multifunctional roles for serum protein fetuin-a in inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification. *J Am Soc Nephrol* 16:2920-2930
- Riondino, S.** Ferroni, P. La Farina, F. Martini, F. Palmirotta, R. Guadagni, F. Basili, S. 2012. Factor seven activating protease activity levels in woman with recurrent pregnancy loss. *Reproductive Sciences* 19:317-321
- Robertson, I.** Jenson, S. Handford, P. 2010. TB domain proteins: Evolutionary insights into the multifaceted roles of fibrillins and LTBP. *Biochem J* 433:263-276
- Robinson, P.N.** Arteaga-Solis, E. Baldock, C. Collod-Beroud, G. Booms, P. De Paepe, A. Dietz, H.C. Guo, Handford, P.A. Judge, D.P. Kielty, C.M. Loeys, B. Milewicz, D.M. Ney, A. Ramirez, F. Reinhardt, D.P. Tiedemann, K. Whiteman, P. Godfrey, M. 2006. The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders. *J Med Genet* 43:769-787
- Römis, J.** Feussner, A. Vermöhlen, S. Stöhr, H.A. 1999. A protease isolated from human plasma activating factor VII independent of tissue factor. *Blood Coagul Fibrinolysis* 10:471-9
- Römis, J., A.** Feussner, C. Nerlich, H.A. Stoeck, and T. Weimer. 2002. The frequent

- Marburg I polymorphism impairs the pro-urokinase activating potency of the factor VII activating protease (FSAP). *Blood Coagul Fibrinolysis*. 13:433-41.
- Rosen, V.** 2009. BMP-2 signaling in bone development and repair. *Cytokine and Growth factors review* 20:475-480
- Ross, R.** 1999. Atherosclerosis- an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126
- Ross, S. and Hill, C.S.** 2008. How Smads regulate transcription. *Int J Biochem Cell Biol* 40:383-408
- Rossi, J.M.** Dunn, N.R. Hogan, B.L. Zaret, K.S. 2001. Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the ectoderm. *Genes Dev* 15: 1998-2009
- Ruppert, R.** Hoffmann, E. Sebald, W. 1996. Human bone morphogenetic protein-2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity. *Eur J Biochem* 237:295-302
- Saltanoff, C.S.** Yang, S. Chen, W. Li, Y.P. 2009. Signalling networks that control the lineage commitment and differentiation of bone cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 19:1-46
- Samad, T.A.** Rebbapragada A, Bell E, Zhang Y, Sidis Y, Jeong SJ, Campagna JA, Perusini S, Fabrizio DA, Schneyer AL, Lin HY, Brivanlou AH, Attisano L, Woolf CJ. 2005. DRAGON, a bone morphogenetic protein co-receptor. *J Biol Chem* 280:14122-9
- Sangle, G.** Ono, R.N. Sasaki, T. Sakai, L.Y. 2011. Prodomains of transforming growth factor beta (TGF-beta) superfamily members specify different functions: Extracellular matrix interactions and growth factor bioavailability. *J Biol Chem* 286:5087-5099
- Saremba, S.** Nickel, J. Seher, A. Kotzsch, A. Sebald, W. and Mueller, T.D. 2008. Type I receptor binding of bone morphogenetic protein 6 is dependent on N-glycosylation of the ligand. *FEBS J* 275:172-183
- Scheufler, C.** Sebald, W. Hülsmeier, M. 1999. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2,7 Å resolution. *J Mol Biol* 287:103-115
- Schilling, D.** Reid IV, J.D. Hujer, A. Morgan, D. Demoll, E. Bummer, P. Fenstermaker, R.A. Kaetzel, D.M. 1998. Loop III region of platelet-derived growth factor (PDGF) B-chain mediates binding to PDGF receptors and heparin. *Biochem J* 333:637-644
- Schluesener HJ,** Meyermann R. 1995. Immunolocalization of BMP-6, a novel TGF-beta-related cytokine, in normal and atherosclerotic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 113:153-6.
- Schultz, G.S.** 2007. The physiology of wound bed preparation. *Surgical Wound Healing and Management* eds M.S. Granick and R.L. Gamelli (Informa Healthcare, Inc) 1-16
- Schultz-Cherry, S.** Chen, F. Moscher, D.F. et al., 1995. Regulation of transforming growth factor-β activation by discrete sequences of thrombospondin-1. *Journal of Biological Chemistry* 270:7304-7310
- Sedding, D.,** J.M. Daniel, L. Muhl, K. Hersemeyer, H. Brunsch, B. Kemkes-Matthes, R.C. Braun-Dullaeus, H. Tillmanns, T. Weimer, K.T. Preissner, and S.M. Kanse. 2006. The G534E polymorphism of the gene encoding the factor VII-activating protease is associated with cardiovascular risk due to increased neointima formation. *J Exp Med*. 203:2801-7.
- Seemann, P.** Schwappacher, R. Kjaer, K.W. Krakow, D. Lehmann, K. Dawson, K. Stricker, S. Pohl, J. Plöger, F. Nickel, J. Sebald, W. Knaus, P. Mundlos, S. 2005. Activating and deactivating mutations in the receptor interaction site of GDF-5 cause symphalangism or brachydactyly type A2. *J Clin Invest* 115:2373-81
- Seidah, N.G.** 2011. What lies ahead for the proprotein convertases? *Ann NY Acad Sci* 1220:149-161
- Seidah, N.G. and Chretien, M.** 1994. Pro-Protein convertases of subtilisin/kexin family. *Methods Enzymol* 244:175-88
- Seidah, N.G. and Chretien, M.** 1999. Proprotein and prohormon convertase: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res* 848:45-62

- Seidah, N.G.** Chretien, M. Day, R. 1994. *Biochimie* 76:197-209
- Seneviratne, A.N.** Sivagurunathan, B. Monaco, C. 2012. Toll-like receptors and macrophage activation in atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta* 413:3-14
- Sengle, G.** Charbonneau, N.L. Ono, R.N. Sasaki, T. Alvarez, J. Keene, D.R. Bachinger, H.P. Sakai, L.Y. 2008. Targeting of bone morphogenetic protein growth factor complexes to fibrillin. *J Biol Chem* 283:13874-13888
- Sengle, G.** Ono, R.N. Sasaki, T. Sakai, L.Y. 2011. Prodomain of transforming growth factor beta (TGFbeta) superfamily members specify different functions: extracellular matrix interactions and growth factor bioavailability. *J Biol Chem* 286:5087-5099
- Shi, M.** Zhu, Wang, R. Chen, X. Mi, L. Walz, T. Springer, T.A. 2011. Latent TGF-beta structure and activation. *Nature* 474:343-349
- Shi, Y.** Wang, Y.F. Jayaraman, L. Yang, H. Massague, J. and Pavletich, N.P. 1998. Crystal structure of a Smad MHI domain bound to DNA: Insights on DNA binding in TGF- β signaling. *Cell* 94:585-594
- Shibamiya, A.,** L. Muhl, S. Tannert-Otto, K.T. Preissner, and S.M. Kanse. 2007. Nucleic acids potentiate Factor VII-activating protease (FSAP)-mediated cleavage of platelet-derived growth factor-BB and inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation. *Biochem J.* 404:45-50.
- Shinde, U. and Inouye, M.** 1993. Intramolecular chaperones and protein folding. *Trends Biochem Sci* 18:442-6
- Shu, B.** Zhang, M. Xie, R. Wang, M. Jin, H. Hou, W. et al., 2011. BMP-2, but not BMP-4, is crucial for chondrocyte proliferation and maturation during endochondral bone development. *J Cell Sci* 124:3428-40
- Sieber, C.** et al., 2009. *Cytokine Growth Factor Rev* 20(5-6)343
- Siegfried, G. Basak, A. Cromlish, J.A. et al., 2003. The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis. *J Clin Invest* 111:1723-1732
- Silen, J.L.** Frank, D. Fujishige, A. Bone, R. Agard, D.A. 1989. Analysis of prepro-alpha-lytic protease expression in Escherichia coli reveals that the pro region is required for activity *J Bacteriol* 171:1320-1325
- Sneddon, J.B.** Zhen, H.H. Montgomery, K. van De, R.E. Tward, A.D. West, R. Gladstone, H. Chang, H.Y. Morganroth, G.S. Oro, A.E. Brown, P.O. 2006. Bone morphogenetic protein antagonist gremlin1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 103:14842-14847
- Sopory, S.** Kwon, S. Wehrli, M. Christian, J.L. 2010. Regulation of Dpp activity by tissue-specific cleavage of an upstream site within the prodomain. *Dev Biol* 346:102-112
- Sorescu, G.P.** Song, H. Tressel, S.L. Hwang, J. Dikalov, S. Smith, D.A. et al., 2004. Bone morphogenetic protein-4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress induces monocyte adhesion by stimulating reactive oxygen species production from a nox-1 based NADPH oxidase. *Circ Res* 95:773-9
- Speer, M.Y.** Yang, H.Y. Brabb, T. Leaf, E. Look, A. Lin, W.L. Frutkin, A. Dichek, D. Giachelli, C.M. 2009. Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. *Circ Res* 104:733-741
- Spinella-Jaegle, S.** Roman-Roman, S. Faucheu, C. Dunn, F-W. Kawai, S. Gallea, S. Stiot, V. Blanchet, A.M. Courtois, B. Baron, R. Rawadi, G. 2001. Opposite effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor- β 1 on osteoblast differentiation. *Bone* 29:323-330
- Stavenuiter, F.** Dienava-Verdoold, I. Boon-Spijker, M.G. Brinkman, H.J. Meijer, A.B. Mertens, K. 2012. Factor seven activating protease (FSAP): does it activate factor VII? *J Thromb Haemost* doi:10.1111/j.1538-7836.2012.04619.x.
- Stawowy, P. and Kappert, K.** 2011. The molecular biology of furin-like proprotein

convertases in vascular remodelling. *Methods Mol Biol* 768:191-206

Stephan, F. Dienava, I. Bulder, I. Wouters, D. Mast, A.E. te Velthuis, H. Aarden, L.A. Zeerleder, S. 2012. Tissue factor pathway inhibitor is an inhibitor of factor VII-activating protease. *J Thromb Haemost* doi:10.1111/j1538-7836.2012.04712.x

Stephan, F., J.A. Hazelzet, I. Bulder, M.A. Boermeester, J.O. van Till, T. van der Poll, W.A. Willemin, L.A. Aarden, and S. Zeerleder. 2011. Activation of factor VII-activating protease in human inflammation: a sensor for cell death. *Crit Care*. 15:R110.

Storm, E.E. and Kingsley, D.M. 1999. GDF-5 coordinates bone and joint formation during digit development. *Dev Biol* 209:11-27

Storm, E.E. Huynh, T.V. Copeland, N.G. Jenkins, N.A. Kingsley, D.M. Lee, S.J. 1994. Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF-beta superfamily. *Nature* 368:639-43

Susan-Resiga, D. Essalmani, R. Hamelin, J. Asselin, M.C. Benjannet, S. Chamberland, A. Day, R. Szumska, D. Constam, D. Bhattacharya, S. Prat, A. Seidah, N.G. 2011. Furin is the major processing enzyme of the cardiac-specific growth factor Bone morphogenetic protein 10. *JBC* 286:22785-22794

Suzuki, Y. Montagne, K. Nishihara, A. Watabe, T. Miyazono, K. 2008. BMPs promote proliferation and migration of endothelial cells via stimulation of VEGF-A/VEGFR2 and angiopoietin-1/Tie2 signalling. *J Biochem* 143:199-206

Sylva, M. Li, V.S. Buffing, A.A. van Es, J.H. van den Born, M. Van der Velden, S. Gunst, Q. Koolstra, J.H. Moorman, A.F. Clevers, H. van den Hoff, M.J. 2011. The BMP antagonist follistatin-like 1 is required for skeletal and lung organogenesis. *PloS One* 6:e22616

Tag, C.G. Mengsteab, S. Weiskirchen, R. Kanse, S.M. 2007. Rapid genotyping of the G534E polymorphism (Marburg I) of the gene encoding the factor VII-activating protease (FSAP) by LightCycler PCR. *Clin Biochem* 40:1063-4

Takahashi, S. Kasai, K. Hatsuzawa, K. Kitamura, N. Misumi, Y. Ikehara, Y. Murakami, K. Nakayama, K. 1993. *Biochem Biophys Res Commun* 195:1019-1026

Takahashi, S. Nakagawa, T. Kasai, K. Banno, T. Duguay, S.J. Van de Ven, W.J. Murakami, K. and Nakayama, K. 1995. *J Biol Chem* 270:26565-26569

Tan, K. and Lawler, J. 2009. The interaction of thrombospondins with extracellular matrix proteins. *Journal of Cell Communication and Signalling* 3:177-187

Thies, R.S. Chen, T. Davies, M.V. Tomkinson, K.N. Pearson, A.A. Shakey, Q.A. Wolfman, N.M. 2001. GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. *Growth Factors* 18:251-9

Thiollay, S. Edwards, J.R. Fingleton, B. Rifkin, D.B. Matrisian, L.M. Lynch, C.C. 2012. An osteoblast-derived proteinase controls tumor cell survival via TGF-beta activation in the bone microenvironment. *PLoS ONE* 7:e29862. doi:10.1371

Thomas, J.T. Prakash, D. Weih, K. Moos, M. Jr. 2006. CDMP1/ GDF-5 has specific processing requirements that restrict its action to joint surfaces. *J Biol Chem* 281:26725-26733

Tian, F. Zhou, A.X. Smits, A.M. Larsson, E. Goumans, M.J. Heldin, C.H. Boren, J. Akyurek, L.M. 2010. Endothelial cells are activated during hypoxia via endoglin/Alk/Smad1/5 signaling in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 392: 283-288

Tian, S. Huajun, W. Wu, J. 2012. Computational prediction of furin cleavage sites by a hybrid method and understanding mechanism underlying diseases. *Scientific Reports* 2:261 DOI:10.1038/srep00261

Toussaint, N.D. et al., 2008. Association between vascular calcification, arterial stiffness and bone mineral density in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 23:586-593

Trompet, S., D. Pons, S.M. Kanse, A.J.M. de Craen, M.A. Ikram, J.J.W. Verschuren, A.H. Zwinderman, P.A.F.M. Doevendans, R.A. Tio, R.B. Winters, P.E. Slagboom, R.G.J.

- Westendorp, and J.W. Jukema. 2011. Factor VII activating protease (FSAP) polymorphism (G534E) is associated with increased risk for stroke and mortality. *Stroke, Research and Treatment*. 2011.
- Tsuji, K.** Bandyopadhyay, A. Harfe, B.D. Cox, K. Kakar, S. Gerstenfeld, L. et al., 2006. BMP-2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet* 38:1424-9
- Turner, M.** Chantry, D. Feldmann, M. 1990. Transforming growth factor β induces the production of interleukin 6 by human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine* 2:211-216
- Tyson KL,** Reynolds JL, McNair R, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM. 2003. Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:489-94
- Valluru, M.** Staton, C.A. Reed, M.W.R. Brown, N.J. 2011. Transforming growth factor- β and endoglin signaling orchestrate wound healing. *Frontiers in Physiology* 2(89):1-12
- Vassalli, J.D.** Sappino, A.P. Belin, D. 1991. The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest* 88:1073-9
- Veverka, V.** Henry, A.J. Slocombe, P.M. Ventom, A. Mulloy, B. Muskett, F.W. Muzylak, M. Greenslade, K. Moore, A. et al., 2009. Characterization of the structural features and interactions of sclerostin: molecular insights into a key regulator of Wnt mediated bone formation. *J Biol Miner Res* 24:578-588
- Viles-Gonzalez, J.F.** Fuster, V. Badimon, J.J. 2004. Atherothrombosis : a widespread disease with unpredictable and life-threatening consequences. *Eur Heart J* 25:1197-207
- von Einem, S.** Erler, S. Bigl, K. Frerich, B. Schwarz, E. 2011. The pro-Form of BMP-2 exhibits a delayed and reduced activity when compared to mature BMP-2. *Growth Factors* 29:63-71
- Vuorio, T.** Jauhiainen, S. Ylä-Herttuala, S. 2012. Pro- and anti-angiogenic therapy and atherosclerosis with special emphasis on vascular endothelial growth factors. *Expert Opin Biol Ther* 12:79-92
- Wahl, S.M.** Allen, J.B. Weeks, B.S. Wong, H.L. Klotman, P.E. 1993. Transforming growth factor β enhances integrin expression and type IV collagenase secretion in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 90:4577-4581
- Wakefield LM,** Smith DM, Flanders KC, Sporn MB. 1988. Latent transforming growth factor-beta from human platelets. A high molecular weight complex containing precursor sequences. *J Biol Chem.* 263:7646-54.
- Walton, K.L.** Makanji, Y. Chen, J. Wilce, M.C. Chan, K.L. Robertson, D.M. Harrison, C.A. 2010. Two distinct regions of latency-associated peptide coordinate stability of the latent transforming growth factor beta1 complex. *J Biol Chem* 285:17029-17037
- Wang, L.** Manson, J.E. Sesso, H.D. 2012. Calcium intake and risk of cardiovascular disease: a review of prospective studies and randomized clinical trials. *American Journal of Cardiovascular Drugs* 12:105-116
- Wang, L.** Manson, J.E. Sesso, H.D. 2012. Calcium intake and risk of cardiovascular disease: a review of prospective studies and randomized clinical trials. *American Journal of Cardiovascular Drugs* 12:105-116
- Wang, Z.** Wang, D.Z. Hochemeyer, D. McAnally, J. Nordheim, A. Olson, E.N. 2004. Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression. *Nature* 428:185-189
- Wasmuth, H.E.,** C.G. Tag, E. Van de Leur, C. Hellerbrand, T. Mueller, T. Berg, G. Puhl, P. Neuhaus, D. Samuel, C. Trautwein, S.M. Kanse, and R. Weiskirchen. 2009. The Marburg I variant (G534E) of the factor VII-activating protease determines liver fibrosis in hepatitis C infection by reduced proteolysis of platelet-derived growth factor BB. *Hepatology*. 49:775-80.

- Weber, D.** Kotzsch, A. Nickel, J. Harth, S. Seher, A. Mueller, U. Sebald, W. Mueller, T.D. 2007. A silent H-bond can be mutationally activated for high-affinity interactions of BMP-2 and activin-type IIB receptor. *BMC Struct Biol* 7,6
- Willeit, J.**, S. Kiechl, T. Weimer, A. Mair, P. Santer, C.J. Wiedermann, and J. Roemisch. 2003. Marburg I polymorphism of factor VII—activating protease: a prominent risk predictor of carotid stenosis. *Circulation*. 107:667-70.
- Willette, R.N.** Gu, J.L. Lysko, P.G. Anderson, K.M. Minehart, H. Yue, T. 1999. BMP-2 gene expression and effects on human vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res* 36:120-125
- Winther, J.R.** and **Sorensen, P.** 1991. Propeptide of carboxypeptidase Y provides a chaperone-like function as well as inhibition of the enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 88:9330-9334
- Wong, G.A.** Tang, V. El-Sabeawy, F. Weiss, R.H. 2003. BMP-2 inhibits proliferation of human aortic smooth muscle cells via p21Cip1/Waf1. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 285:740-754
- Wong, M.L. and Medrano, J.F.** 2005. Real-time PCR for mRNA quantification. *BioTechniques* 39:75-85
- Wrighton, K.H.** Lin, X. Feng, X.H. 2009. Phospho-control of TGF- β superfamily signaling. *Cell Res* 19:8-20
- Wygrecka, M.**, R.E. Morty, P. Markart, S.M. Kanse, P.A. Andreasen, T. Wind, A. Guenther, and K.T. Preissner. 2007. Plasminogen activator inhibitor-1 is an inhibitor of factor VII-activating protease in patients with acute respiratory distress syndrome. *J Biol Chem*. 282:21671-82.
- Xiao YT,** Xiang LX, Shao JZ. 2007. Bone morphogenetic protein. *Biochem Biophys Res Commun* 362:550-3
- Xiong, J. and O'Brien, C.A.** 2012. Osteocyte RANKL: New insights into the control of bone remodeling. *Journal of Bone and Mineral Research* 27:499-505
- Xu, C.P.** Ji, W.M. van den Brink, G.R. Peppelenbosch, M.P. 2006. Bone morphogenetic protein-2 is a negative regulator of hepatocyte proliferation downregulated in the regenerated liver. *World J Gastroenterol* 12(47):7621-7625
- Yamamichi S,** Nishitani M, Nishimura N, Matsushita Y, Hasumi K. 2010. Polyamine-promoted autoactivation of plasma hyaluronan-binding protein. *J Thromb Haemost.* 8(3):559-66. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03641.x.
- Yamamichi, S.,** Y. Fujiwara, T. Kikuchi, M. Nishitani, Y. Matsushita, and K. Hasumi. 2011. Extracellular histone induces plasma hyaluronan-binding protein (factor VII activating protease) activation in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*.
- Yamanaka, R.** Otsuka, F. Nakamura, K. Yamashita, M. Otani, H. Takeda, M. Matsumoto, Y. Kusano, K.F. Ito, H. Makino, H. 2010. Involvement of the bone morphogenetic protein system in endothelin- and aldosterone-induced cell proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells isolated from human patients with pulmonary arterial hypertension. *Hypertens Res* 33:435-45
- Yang, L.** Tredget, E.E. Ghahary, A. 2000. Activation of latent transforming growth factor beta-1 is induced by mannose 6-phosphate/insulin like growth factor-II receptor. *Wound repair Regen* 8:538-46
- Yao, Y.** Watson, A.D. Ji, S. Bostrom, K.I. 2009. Heat shock protein 70 enhances vascular bone morphogenetic protein-4 signalling by binding matrix Gla protein. *Circ Res* 105:575-584
- Young, G.D. and Murphy-Ullrich, J.** 2004. The tryptophan motifs of the thrombospondin type I repeats bind motifs in the latent transforming growth factor- β complex. *Journal of Biological Chemistry* 270:47633-47642
- Zaidi, S.H.E.** Huang, Q. Momen, A. Riazi, A. Husain, M. 2010. Growth differentiation factor 5 regulates cardiac repair after myocardial infarction. *Journal of the American*

College of Cardiology 55:135-143

Zakai, N.A. and McClure, L.A. 2011. Radical differences in venous thromboembolism. *J Thromb Haemost* 9:1877-82

Zeerleder S, Zwart B, te Velthuis H, Manoe R, Bulder I, Rensink I, Aarden LA. 2007. A plasma nucleosome releasing factor (NRF) with serine protease activity is instrumental in removal of nucleosomes from secondary necrotic cells. *FEBS Lett.* 58:5382-8.

Zeerleder S, Zwart B, te Velthuis H, Stephan F, Manoe R, Rensink I, Aarden LA. 2008. Nucleosome-releasing factor: a new role for factor VII-activating protease (FSAP). *FASEB J.* 22:4077-84

Zhang, H. and **Bradley, A.** 1996. Mice deficient for BMP-2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development* 122:2977-2986

Zhang, S. Fantozzi, I. Tigno, D.D. Yi, E.S. Platoshyn, O. Thistlethwaite P.A. et al., 2003. Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 285:740-754

Zhang, Y. Khan, D. Delling, J. Tobiasch, E. 2012. Mechanisms underlying the osteo- and adipo-differentiation of human mesenchymal stem cells. *The Scientific World Journal* Article ID:793823 doi:10.1100/2012/793823

Zhao, M. Qiao, M. Harris, S.E. Chen, D. Oyajobi, B.O. Mundy, G.R. 2006. *Mol Cell Biol* 26:6197-6208

Zhou, A.J. Zhu, Z. Clokie, C.M.L. Peel, S.A.F. 2012. Mutation of a cleavage site adjacent to the mature domain leads to increase in secreted mature BMP-2 with reduced activity. *Growth Factors* DOI:10.3109/08977194.2012.686497

10 Publikationsliste

Durch die vorliegende Dissertationsschrift ist folgendes Manuskript entstanden:

Rödel, E. K., Plöger, F. Schwarz, E. and Kanse, S.M. 2012. The factor VII activating protease activates members of the TGF- β family. In Vorbereitung zur Einreichung bei *Journal of Biochemistry*

Aktive Kongressteilnahmen:

- | | |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 06/ 2012 | <u>Posterpräsentation</u> “ <i>Paracrine regulation of platelet derived growth factor-BB and bone morphogenetic protein-2 by Factor VII-activating protease</i> ”
IVBM Kongress
Wiesbaden |
| 07/ 2011 | <u>Posterpräsentation</u> “ <i>The Factor VII-activating protease (FSAP) enhances the activity of transforming growth factor-β family members</i> ”
23. Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH)
Kyoto, Japan |
| 02/ 2011 | <u>Vortrag</u> “ <i>The Factor VII-activating protease (FSAP) increases the activity of transforming growth factor-beta (TGF-beta) family members.</i> ”
55. Kongress der “Gesellschaft für Thrombose und Hämostase” (GTH)
Wiesbaden |
| 07/ 2010 | <u>Posterpräsentation</u> “ <i>Factor seven activating protease (FSAP) can activate members of the transforming growth factor (TGF) family of growth factors</i> ”
1. Internationales Symposium des Exzellenzclusters „Kardiopulmonares System“ (ECCPS)
Bad Nauheim |

- 02/ 2010 Posterpräsentation *“Factor seven activating protease (FSAP) can activate members of the transforming growth factor (TGF) family of growth factors ”*
54. Kongress der “Gesellschaft für Thrombose und Hämostase” (GTH)
Wiesbaden
- 07/ 2009 Posterpräsentation *“Analysis of the structural basis for the altered enzymatic activity in the G534E polymorphism of FSAP (Factor VII activating protease) ”*
Forschungsretreat des Exzellenzclusters „Kardiopulmonares System
“ (ECCPS)
Bad Nauheim

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

11 Danksagung

Ich möchte mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Preissner bedanken, die mich zu Beginn meiner Arbeit sehr herzlich willkommen hat, und stets ein angenehmes Arbeitsklima ermöglichte.

Desweiteren danke ich Herrn Prof. Preissner dafür, dass er es mir ermöglichte, diese Doktorarbeit in seinen Institutsräumen und seinen bereitgestellten Geräten und Hilfsmitteln durchzuführen, sowie an seinem Interesse an meiner Arbeit.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich Prof. Sandip Kanse ausstellen, der mir dieses spannende Thema zur Verfügung gestellt hat, und mich während der praktischen Arbeit stets durch anregende Diskussionen gut betreut hat.

Das positive Voranschreiten dieser Doktorarbeit ermöglichte mir eine internationale Kongressteilnahme im bezaubernden Japan und wird mir ewig in Erinnerung bleiben.

Ich danke Herrn Prof. Friedhoff für die Bereitschaft meine Arbeit im Fachbereich 08 zu betreuen, und die guten Denkanstöße in experimenteller Hinsicht.

Außerdem danke ich Frau Prof. Schwarz, mit der ich eine fruchtbare Kooperation pflegte. Daher danke ich ihr vielmals für ihr hohes Interesse an meiner Arbeit, sowie die sehr großzügige Bereitstellung von rekombinanten BMP-2 sowie der BMP-2 cDNA-Sequenz.

Die Zeit mit der Arbeitsgruppe war wirklich sehr schön, und ich danke jeden Einzelnen.

Besonders hervorheben möchte ich allerdings Thomas Schmidt-Wöll (mehr als exzellent!), Susanne Tannert-Otto und Karin Hersemeyer, die mir bei allen technischen Fragen stets gerne weiterhalfen.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an meine jungen Mitstreiterinnen (besonders Silke Leiting und Julia Gansler) und an alle DoktorandInnen der Arbeitsgruppe. Mit euch konnte stets (wissenschaftlich) diskutiert, gelacht, oder auch mal ein Luftballon zertreten werden! Mit Team Oslo wurde es niemals langweilig im Laboralltag. Anke Langer danke ich für ihre Organisation, die nette Begrüßung am morgen, sowie ihre göttliche Donauwelle!

Der größte Dank gilt allerdings meiner Familie, die mich immer bedingungslos unterstützt hat, und deren Liebe mir unendlich viel Kraft gibt!

VIELEN DANK!!!

*„Die Natur findet ihren Weg.“
(Jurassic park, Warner Bros.)*